

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Proliferation von Mikrogliazellen und Astrozyten
im Gyrus dentatus der Ratte
nach experimenteller Läsion des entorhinalen Kortex**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Anne Grampp
aus Kulmbach

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Nitsch
 2. PD Dr. med. G. Raivich
 3. Prof. Dr. med. A. Fontana

Datum der Promotion: 6. 10. 2000

für M-V-B-Ö

"This is my theory. It belongs to me & I own it."

(Änn Elk: Cleese-J, Idle-E et al.)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1	Anatomische und physiologische Grundlagen.....	10
1.1.1	Hippokampus-Formation.....	10
1.1.2	<i>Tractus perforans</i>	11
1.2	Einführung in die Pathophysiologie der entorhinalen Läsion.....	13
1.2.1	Entorhinale Kortextläsion.....	13
1.2.2	Transneuronalen Veränderungen.....	13
1.2.3	Reaktives Sprouting und Synaptogenese.....	14
1.3	Gliareaktionen auf entorhinale Läsion.....	14
1.3.1	Mikroglia-Aktivierung.....	14
1.3.2	Astrozytäre Reaktionen.....	15
1.3.3	Phagozytose.....	15
1.3.4	Expression von immunologischen Zellmarkern.....	15
1.3.5	Produktion von humoralen Faktoren.....	16
1.3.6	Zunahme der Zellzahl: Migration oder Proliferation?.....	16
1.4	Zielstellung.....	17

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1	Proliferationskinetische Untersuchungen.....	18
2.2	Grundlagen der Immunhistochemie.....	24
a)	Histochemische Darstellung von Mikrogliazellen.....	24
b)	Immunhistochemische Darstellung von Astrozyten.....	24
c)	Immunhistochemische Darstellung BrdU-positiver Zellen.....	25
d)	Die nach Hsu <i>et al.</i> modifizierte ABC-Methode.....	25

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	27
3.2	Zusammensetzung des Anästhetikums.....	27
3.3	Zusammensetzung der Fixativflüssigkeit.....	28
3.4	Zusammensetzung des verwendeten Puffers.....	28
3.4.1	PBS.....	28
3.4.2	Spülpuffer.....	28

3.5	Chemikalien für die morphologische Untersuchung.....	29
3.5.1	Darstellung von Mikroglia.....	29
3.5.2	Darstellung von Astrozyten.....	29
3.6	Chemikalien für die proliferationskinetische Untersuchung.....	30
3.7	Einteilung der Versuchstiergruppen.....	30
3.8	Versuchsablauf.....	31
3.8.1	Entorhinale Läsion.....	31
3.8.2	Applikation von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin und transkardiale Perfusion.....	33
3.8.3	Immunhistochemie.....	33
a)	Darstellung von Mikroglia durch <i>Griffonia simplicifolia</i> Isolektin B ₄	34
b)	Immunhistochemische Darstellung von GFAP.....	34
c)	Immunhistochemische Darstellung von BrdU.....	34
d)	Negativkontrolle ohne Primärantikörper gegen BrdU.....	35
3.9	Morphologische und proliferationskinetische Auswertung.....	36
3.9.1	Gesichtsfelder.....	36
3.9.2	Auswertungskriterien und Auszählung der Gesichtsfelder.....	36
3.10	Statistische Auswertung.....	39

4. ERGEBNISSE

4.1	Untersuchungen an Mikrogliazellen.....	41
4.1.1	Beschreibung der histologischen Präparate.....	41
a)	Kontrollstadium (Versuchstiergruppe 1).....	41
b)	Tag 3 nach Läsion (Versuchstiergruppe 2).....	42
c)	Tag 10 nach Läsion (Versuchstiergruppe 4).....	43
d)	Tag 30 nach Läsion (Versuchstiergruppe 5).....	44
4.1.2	Zellzählung und proliferationskinetische Auswertung bei der Mikroglia...	45
a)	Mikrogliazellzahlen nach entorhinaler Läsion.....	45
b)	Zahlen proliferierender Mikrogliazellen nach entorhinaler Läsion.....	45
c)	Der Labeling Index als Marker der Proliferationsquote von Mikrogliazellen.....	46
d)	Vergleich der Mikroglia proliferationsaktivität ipsi- und kontralateral zur entorhinalen Läsion.....	47
4.2	Untersuchungen an Astrozyten.....	49
4.2.1	Beschreibung der histologischen Präparate.....	49

a)	Kontrollstadium (Versuchstiergruppe 1).....	49
b)	Tag 3 nach Läsion (Versuchstiergruppe 2).....	50
c)	Tag 7 nach Läsion (Versuchstiergruppe 3).....	51
d)	Tag 10 nach Läsion (Versuchstiergruppe 4).....	52
e)	Tag 30 nach Läsion (Versuchstiergruppe 5).....	53
f)	Tag 100 nach Läsion (Versuchstiergruppe 6).....	54
4.2.2	Zellzählung und proliferationskinetische Auswertung bei den Astrozyten.	55
a)	Astrozytenzahlen nach entorhinaler Läsion.....	55
b)	Zahlen proliferierender Astrozyten nach entorhinaler Läsion.....	56
c)	Der Labeling Index als Marker der Proliferationsquote von Astrozyten....	57
d)	Vergleich der Astrozytenproliferationsaktivität ipsi- und kontralateral zur entorhinalen Läsion.....	58
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
4.3.1	Mikroglia.....	60
4.3.2	Astrozyten.....	61
5.	<u>DISKUSSION</u>	
5.1	Fragestellung und Ziel.....	62
5.2	Interpretation der eigenen Ergebnisse.....	63
5.2.1	Rolle von Proliferation und Migration.....	63
5.2.2	Astrozyten-Zellzahlenanstieg und GFAP-Reaktivität.....	63
5.2.3	Abnahme der Astrozytenzahlen in den frühen Stadien.....	64
5.2.4	Beteiligung humoraler Faktoren an der Gliareaktion.....	64
5.2.5	Unerwartet starke Reaktionen in der Körnerzellschicht.....	66
5.2.6	Kontralaterale Aktivierung.....	66
5.3	Beurteilung der BrdU-Methode für proliferationskinetische Untersuchungen.....	67
5.4	Ausblick.....	67
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	69
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	71
8.	<u>ANHANG</u>	76

Abkürzungsverzeichnis

2N	2-Normal
[³ H]	Tritium
A	Adenin
aB	anguläres Bündel
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
B	Biotin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BRAB	“bridged” Avidin-Biotin-Technik
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin
C	Cytosin
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CCK	Cholezystokinin
CNTF	ciliary neurotrophic factor
contra	kontralateral
ctrl	Kontrolle
DAB	3',3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat
DG	dentate gyrus (<i>Gyrus dentatus</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpl	days post lesion (Tage nach Läsion)
EC	entorhinal cortex (entorhinaler Kortex)
ECL	entorhinal cortex lesion (entorhinale Kortextläsion)
FGF	fibroblast growth factor
Fi	Fimbria
G	Guanin
G ₀	Ruhephase im Zellzyklus (G = engl. gap, Lücke)
G ₁	Wachstumsphase im Zellzyklus
G ₂	Prämitotische Phase im Zellzyklus
GABA	γ-Aminobuttersäure (gamma amino butyric acid)

GCL	granule cell layer (Körnerzellschicht)
Gf	Gesichtsfeld
GFAP	glial fibrillary acidic protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
IB ₄	<i>Griffonia simplicifolia</i> Isolektin B ₄
IBRAB	indirect bridged avidin-biotin technique
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1
IML	inner molecular layer (innere Molekularschicht)
ipsi	ipsilateral
KG	Körpergewicht
LI	labeling index (Färbeindex)
li	links
M	Mol
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ML	molecular layer (Molekularschicht)
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	messenger- (engl. "Boten"-) Ribonukleinsäure
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum (normales Ziegenserum)
OML	outer molecular layer (äußere Molekularschicht)
PBS	phosphate buffered saline
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMZ	postmitotische Zelle
POD	Peroxidase
re	rechts
RNS	Ribonukleinsäure
S	Subikulum
S-Phase	DNA-Synthesephase im Zellzyklus
T	Thymin
U	Uracil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der “Proliferation von Mikrogliazellen und Astrozyten im *Gyrus dentatus* der Ratte nach experimenteller Läsion des entorhinalen Kortex”. Zum Einstieg werden die anatomisch-physiologischen und pathophysiologischen Grundlagen der Hippokampusformation dargelegt. Auf die wichtigsten beteiligten glialen und anderen zellulären Strukturen und Mechanismen wird dabei besonders eingegangen.

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

1.1.1 Hippokampus-Formation

Die Hippokampus-Formation setzt sich aus folgenden Regionen zusammen: *Gyrus dentatus* (DG=dentate gyrus), Hippocampus proper (unterteilt in die Felder CA3, CA2, CA1), Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum und entorhinaler Kortex (EC) [1]. Die Hippokampus-Formation ist ein phylogenetisch sehr alter Teil des Großhirnkortex, sie nimmt bei der Ratte einen großen Anteil am gesamten Kortex ein. Teile der Hippokampus-Formation, nämlich der *Gyrus dentatus*, der Hippocampus proper und das Subikulum, gehören zum dreischichtig aufgebauten Allokortex. Der *Gyrus dentatus* besteht aus der Molekularschicht (ML=molecular layer, unterteilt in äußere und innere Molekularschicht OML=outer molecular layer und IML=inner molecular layer) und der Körnerzellschicht (GCL=granule cell layer). Die Regionen der Hippokampus-Formation unterhalten mehrere afferente und efferente Faserverbindungen untereinander und mit anderen Kortexanteilen. Bei den Verbindungen innerhalb der Hippokampus-Formation herrschen charakteristischerweise unidirektionale Projektionen vor, was für kortiko-kortikale Verbindungen untypisch ist [1].

1.1.2 Tractus perforans

Die wichtigste entorhinale Projektion zum *Gyrus dentatus*, der *Tractus perforans* (PP=perforant path), wurde erstmals 1901 durch Ramon y Cajal beschrieben [2]. Der glutamaterge *Tractus perforans* ist die wichtigste kortikale Afferenz des *Gyrus dentatus* und trägt auch zur Innervation des Hippocampus proper und des Subikulums bei. Die Fasern des *Tractus perforans* (s. Abb. 1) nehmen ihren Ursprung größtenteils von Neuronen in den Schichten II und III des entorhinalen Kortex, verlaufen über die darunterliegende weiße Substanz und das anguläre Bündel, durchqueren die Pyramidenzellschicht des Subikulums und kreuzen die *Fissura hippocampi* [1]. Die Faserqualität des *Tractus perforans* ist größtenteils exzitatorisch, da glutamaterg. Einige Terminalen des PP reagieren immunoreaktiv für Enkephalin bzw. CCK, und es gibt auch GABAerge Neurone, deren Fasern mit dem PP verlaufen [1].

Das Terminationsgebiet des *Tractus perforans* erstreckt sich auf die Körnerzelldendriten, welche sich in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* verzweigen. Teile des *Tractus perforans* endigen außerdem an den distalen Anteilen der Pyramidenzelldendriten des Hippokampus (*Stratum lacunosum moleculare* von CA1 und CA3) und des Subikulums [15]. Dabei projizieren Neurone aus dem medialen entorhinalen Kortex in die mittlere Molekularschicht, laterale Anteile des entorhinalen Kortex innervieren die äußere Molekularschicht des *Gyrus dentatus* [57; 36]. Zum größten Teil verläuft der *Tractus perforans* ipsilateral, zu einem kleinen Teil aber als sogenannter "gekreuzter *Tractus perforans*" auch zum kontralateral gelegenen *Gyrus dentatus* [1].

Diese Verbindung spielt eine wichtige Rolle bei der entorhinal-hippokampalen Prozessierung von Lernen und Gedächtnis [43]. Von pathophysiologischem Interesse ist, daß der entorhinale Kortex im Alterungsprozeß besonders frühe und ausgeprägte pathologische Veränderungen zeigt [27].

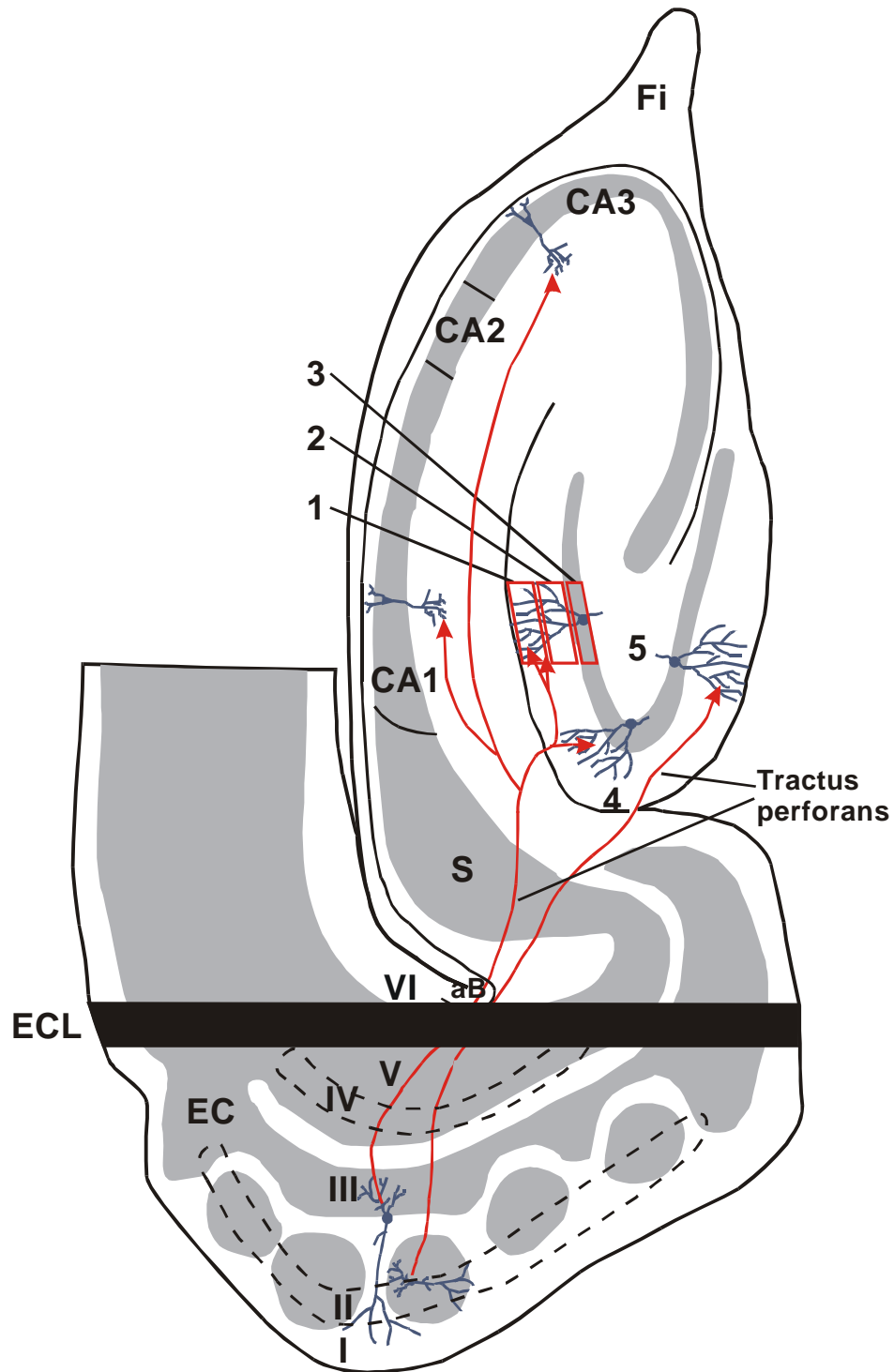


Abb. 1: Anatomie der Hippokampusformation bei höheren Säugern. DG=Gyrus dentatus (1=äußere Molekularschicht, 2=innere Molekularschicht, 3=Körnerzellschicht, 4=Fissura hippocampi, 5=Hilus), CA1/2/3=Abschnitte des Hippocampus proper, Fi=Fimbria, S=Subikulum, aB=anguläres Bündel, EC=entorhinaler Kortex (I/II/III/IV/V/VI=Schichten des entorhinalen Kortex), ECL=entorhinale Kortexläsion. Die Abbildung zeigt den Verlauf des *Tractus perforans*.

1.2 Einführung in die Pathophysiologie der entorhinalen Läsion

1.2.1 Entorhinale Kortexläsion

Die experimentelle Läsion des entorhinalen Kortex ist ein weit verbreitetes und häufig angewandtes Modell zur Simulation und Erforschung von adaptiven Veränderungen im zentralen Nervensystem [56; 51; 52; 2; 6; 15; 43; 10] sowie von zellulären und molekularen Mechanismen während axonaler Degeneration und Reinnervation [36; 30; 10].

Entorhinale Läsionen bei der Ratte bewirken eine Deafferenzierung des ipsilateralen *Gyrus dentatus*. Es gibt hier auffallende Parallelen zur Reaktion des menschlichen zentralen Nervensystems auf eine Denervierung bei Alzheimerscher Erkrankung [15; 27]. Die Läsion des entorhinalen Kortex bei der Ratte kann als Modell für Aspekte neurodegenerativer Pathomechanismen bei Morbus Alzheimer [51; 6; 43; 2; 15; 52] und bei Temporallappenepilepsie [52] eingesetzt werden.

1.2.2 Transneuronale Veränderungen

Die ECL unterbricht die Innervation des ipsilateralen hippocampalen *Gyrus dentatus* über den *Tractus perforans*. Im *Tractus perforans* kommt es zu einer anterograden Degeneration der Axone [34; 36; 10; 26], was in deren Terminationszone, der äußeren Molekularschicht des *Gyrus dentatus*, transneuronale Veränderungen hervorruft. In der Molekularschicht beobachtet man eine massive Degeneration von 80-90% der Synapsen [36; 10; 57], und das Gewebe der Molekularschicht schrumpft insgesamt [36]. Man beobachtet nach der Deafferenzierung bei den Dendriten GABAerger, Parvalbumin-positiver Neurone ein Anschwellen sowie eine Retraktion aus der Terminationszone des PP, und damit einen zahlenmäßigen Rückgang, der bestehen bleibt [39; 38]. Von der Denervierung betroffene Körnerzellen dagegen zeigten vorübergehende Veränderungen in ihrer Dendritenstruktur und entwickelten neue Synapsen mit aussprossenden unladierten Afferenzen [39].

1.2.3 Reaktives Sprouting und Synaptogenese

Die Deafferenzierung der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* bewirkt ein Aussprossen (sog. "Sprouting") von Axonkollateralen unlädierter cholinergischer septohippokampaler Afferenzen [4; 30; 35; 36; 58; 10; 27]. Daraufhin bilden sich neue Synapsen in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* [2; 39; 36; 61; 5; 10; 26; 33; 13; 30]. Jensen *et al.* (1994) haben dieses Phänomen des "Sprouting" bereits drei Tage nach ECL beobachtet. Die reaktive Synaptogenese setzt ungefähr 10-14 Tage nach Läsion ein [57]. Es ist ein oft beobachtetes Phänomen, daß deafferenzierte Neurone durch überlebende afferente Systeme reinnerviert werden, die in der Nähe dieser deafferenzierten Gebiete terminieren [57].

1.3 Gliareaktionen auf entorhinale Läsion

1.3.1 Mikroglia-Aktivierung

Eine entorhinale Läsion ruft eine Vielzahl von Gliareaktionen im Hippokampus hervor, die ihren Teil zu den postläsionalen Veränderungen im deafferenzierten *Gyrus dentatus* beitragen [9; 13; 14; 16; 49; 10; 26; 51]. Diese Aktivierung ist durch eine Erhöhung der Zellzahlen und durch typische morphologische und funktionelle Veränderungen von Gliazellen gekennzeichnet.

Bereits innerhalb von 24 Stunden nach Läsion haben Fagan und Gage (1994) und Gehrmann *et al.* (1991) eine Mikrogliaaktivierung beobachtet. Die aktivierten Mikrogliazellen erscheinen dann durch Retraktion ihrer Fortsätze gerundet und entwickeln die Fähigkeit zu amöboider Bewegung, Phagozytose und Proliferation [9].

1.3.2 Astrozytäre Reaktionen

Astrozyten reagieren im Vergleich zur Mikroglia erst später auf eine ECL [48; 14; 62; 63; 9; 16; 26]. Die Fortsätze der hypertrophischen Astrozyten werden dicker, und die Zellen weisen eine gesteigerte Immunreaktivität für glial fibrillary acidic protein (GFAP) [10], ein astrozytenspezifisches Intermediärfilamentprotein [44], auf. Diese sogenannte reaktive "Gliosis" von Astrozyten [60; 49; 16; 13; 26; 45; 51] ist in der äußeren Molekularschicht ab Tag drei nach Läsion beobachtet worden, sie erreicht einen Höhepunkt vier bis sieben Tage nach Läsion und verschwindet ungefähr drei bis vier Wochen nach Läsion [13; 34; 49; 9; 10; 26].

1.3.3 Phagozytose

In der denervierten Region wurde sowohl bei Mikrogliazellen [16; 10] als auch bei Astrozyten [30; 47; 5] eine Phagozytoseaktivität beschrieben. Die aktivierten Gliazellen phagozytieren Nervenzellabfall, wie z.B. degenerierende Axonterminalen [3; 26].

1.3.4 Expression von immunologischen Zellmarkern

An Gliazellen beobachtet man im *Gyrus dentatus* eine Expression von Adhäsionsmolekülen. Diese dienen wahrscheinlich dazu, immunkompetente Zellen zu rekrutieren und Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen aufzubauen, und sind so in die Phagozytosevorgänge involviert [23]. Die Expression von Molekülen des major histocompatibility complex (MHC) auf Gliazellen als Zeichen einer Antigenpräsentation kann zu Aktivierung von immunkompetenten Zellen wie T- und B-Lymphozyten führen. Laut Fagan und Gage (1994) kommt es nach Läsion des *Tractus perforans* jedoch nicht zu einer vermehrten Expression von MHC II auf Mikrogliazellen im denervierten Gebiet.

1.3.5 Produktion von humoralen Faktoren

Humorale Faktoren scheinen die auf eine ECL folgende Gliareaktion sowie das cholinerge Sprouting zu beeinflussen. Es gibt z.B. Untersuchungen zum nerve growth factor (NGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [11; 31; 19; 29]. Gall *et al.* (1979) vermuteten, daß von degenerierenden Axonen und Terminalen Triggersubstanzen freigesetzt werden, die das Verhalten der Mikroglia beeinflussen. Man nimmt auch an, daß Interleukin-1, produziert von Mikrogliazellen, eine Signal- und Reaktionskaskade unter den Gliazellen auslösen kann. Diese könnte zum cholinergen Sprouting führen [9; 13; 16].

1.3.6 Zunahme der Zellzahl: Migration oder Proliferation?

Es gibt unterschiedliche Meinungen darüber, ob nach ECL die Gliazellzahl im *Gyrus dentatus* überhaupt zunimmt [49; 14], und weiterhin, ob Gliazellen dann von außerhalb einwandern oder lokal proliferieren, oder ob beides zutrifft [49; 10]. Die von einigen Autoren beobachtete deutliche zahlenmäßige Zunahme der Gliazellen in der deafferenzierten Molekularschicht nach ECL [9; 13; 14; 34; 45] kann durch Migration von Gliazellen in das denervierte Areal hinein, durch erhöhte Detektierbarkeit oder durch ortsständige Gliazellproliferation [14; 10; 34; 16; 26; 45] begründet sein. Autoren haben eine Mikroglia proliferation beschrieben, die 24 Stunden nach ECL einsetzt, zwei bis drei Tage nach Läsion ein Maximum erreicht und drei [14] bzw. acht Tage nach Läsion [16] auf Kontrollwerte zurückgeht. Fagan und Gage (1994) haben von einer Mikroglia proliferation einen und drei Tage nach Läsion und von einer weniger ausgeprägten Astrozytenproliferation drei Tage nach Läsion berichtet.

Die beobachtete Zellzahlerhöhung und die Frage nach einer Gliazellproliferation ergaben den Anlaß zu einer genaueren experimentellen Untersuchung dieser Fragestellung.

1.4 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die präzise Quantifizierung der Zellzahlen und Proliferationsraten von Mikrogliazellen und Astrozyten in der inneren und äußeren Molekularschicht sowie in der Körnerzellschicht des ipsi- und kontralateralen Hippokampus der Ratte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einseitiger ECL. Hierbei sollte der Zeitraum von 3-100 Tagen nach ECL untersucht werden. Mit Hilfe der Immunhistochemie und der Methode mit Bromodeoxyuridin (BrdU) wurden morphologische und proliferationskinetische Untersuchungen durchgeführt. Bei der Auswertung sollten die Daten der verschiedenen Überlebensstadien in Relation zu den Daten scheinoperierter Kontrolltiere gesetzt werden, um eine Aussage über die jeweiligen Veränderungen in den einzelnen postläsionalen Stadien machen zu können.

Zusammenfassend sollte zu folgenden Fragen Stellung genommen werden:

- A) Welches morphologische Erscheinungsbild zeigen Mikrogliazellen und Astrozyten im ipsi- und kontralateralen *Gyrus dentatus* zu verschiedenen Zeitpunkten nach ECL?
- B) Wie verändern sich die Zellzahlen von Mikroglia und Astrozyten im ipsi- und kontralateralen *Gyrus dentatus* in den verschiedenen Stadien nach ECL?
- C) Wie entwickelt sich die Zahl der proliferierenden Gliazellen im ipsi- und kontralateralen *Gyrus dentatus* in den verschiedenen postläsionalen Stadien?
- D) Wie groß ist der Anteil proliferierender Mikrogliazellen und Astrozyten an der Gesamtzahl der jeweiligen Zellart im ipsi- und kontralateralen *Gyrus dentatus* nach ECL?
- E) Zeigen sich in den untersuchten Stadien bei beiden Zellarten Unterschiede zwischen den gewonnenen Werten der ipsilateral und kontralateral zur Läsion liegenden Hippokampi?

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Proliferationskinetische Untersuchungen

Proliferationskinetische Untersuchungen dienen zum quantitativen Nachweis sich replizierender Zellen. Zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Idee soll zunächst der Ablauf des Zellzyklus veranschaulicht werden.

Der Zellzyklus (s. Abb. 2) besteht aus einzelnen, verschieden lang dauernden Phasen. Man unterscheidet die eigentliche Phase der Zellteilung, die Mitose, von der Interphase, der zwischen zwei Mitosen liegenden Arbeitsphase. Innerhalb der Interphase werden mindestens drei Abschnitte unterschieden: Direkt im Anschluß an eine Mitose befindet sich die gewöhnliche, teilungsfähige Zelle in einer je nach Zellart unterschiedlich langen Wachstumsphase, der G_1 -Phase (G=gap, engl. Lücke). Die Zelle bildet in dieser Phase zelleigene Proteine und bereitet die S-Phase (Synthesephase) vor [32]. Bei Astrozyten beläuft sich die Dauer der G_1 -Phase einschließlich des Übergangs von der G_0 - zur G_1 -Phase nach Langan und Slater (1991) auf zwölf Stunden. Die darauf folgende S-Phase dauert im Durchschnitt etwa sieben Stunden [32], für Astrozyten laut Langan und Slater (1991) 20 Stunden. Sie dient der Verdopplung der DNS, eine wichtige Voraussetzung für die Mitose. Anschließend folgt die prämitotische G_2 -Phase, die in jedem Fall zu einer Mitose überleitet. Langan und Slater (1991) veranschlagen bei Astrozyten zehn Stunden für G_2 -Phase und Mitose zusammen. Nach der Mitose kann eine Zelle auch in die G_0 -Phase eintreten. Diese ist als eine sehr lange Periode beschrieben, aus der Zellen nur auf bestimmten Reiz hin wieder in die G_1 -Phase einmünden [32; 28]. So kann der zeitliche Abstand von einer Mitose bis zur nächsten zwischen Stunden und Monaten variieren. Sogenannte postmitotische Zellen (PMZ), wie z.B. die meisten Nervenzellen, haben die Fähigkeit zur Proliferation gänzlich verloren [32]. Mikrogliazellen und Astrozyten befinden sich beim adulten Säuger normalerweise in der G_0 -Phase und besitzen im adulten ZNS nur ein begrenztes proliferatives Potential [8]. Doch können sie unter geeigneten Bedingungen auf bestimmte Reize hin wieder in den Zellzyklus eintreten und proliferieren [28].

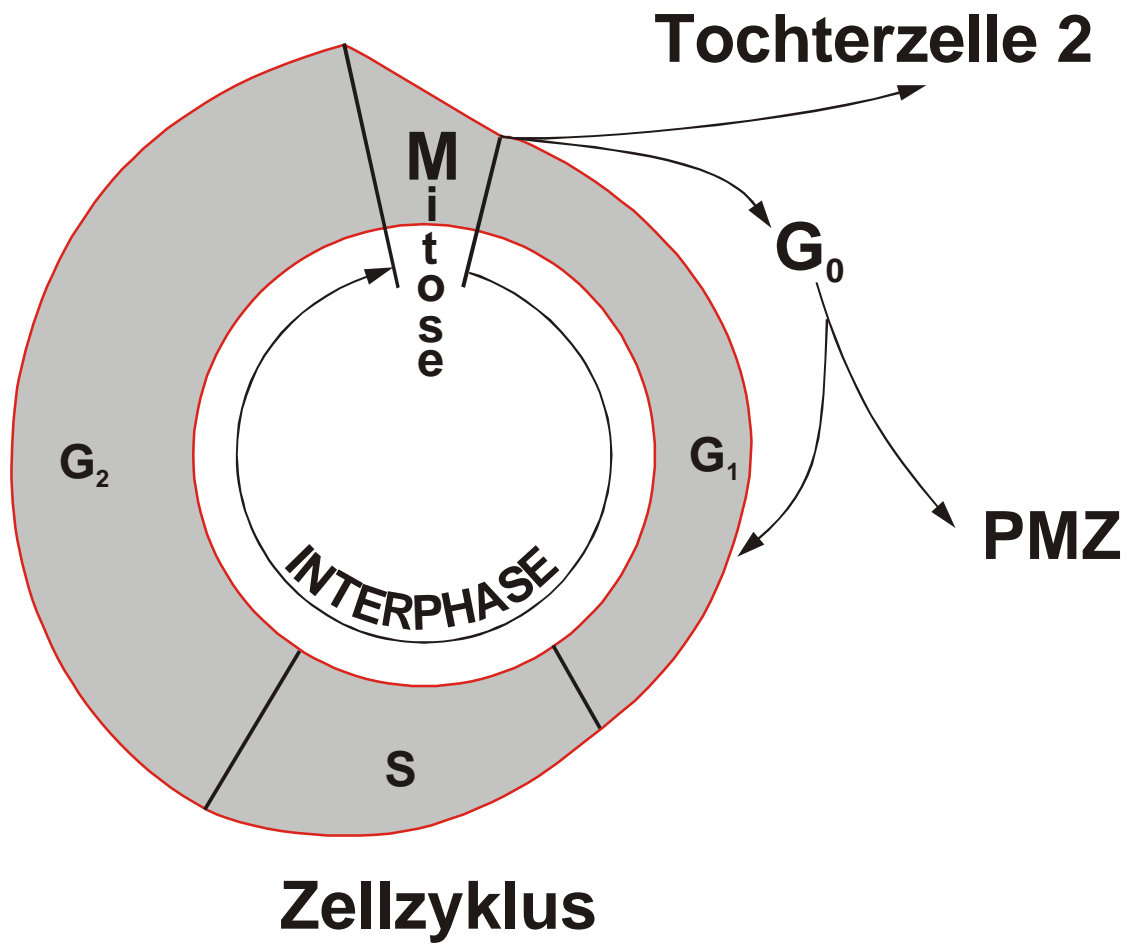


Abb. 2: Zellzyklus (nach Leonhardt, 1990, Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, S.54, Abb. 35). Phasen des Zellzyklus: Mitose, G₁-Phase, S=Synthesephase, G₂-Phase; G₀-Phase. PMZ=postmitotische Zelle.

1951 beschrieben Howard und Pelc die DNS-Synthesephase (S-Phase) als einen begrenzten Zeitabschnitt innerhalb des Zellzyklus [24]. Taylor *et al.* entwickelten daraufhin eine Nachweismethode für proliferierende Zellen, indem sie mit radioaktivem Tritium (^3H) markiertes Thymidin verwendeten. Dieses wird analog zum DNS-Bestandteil Thymidin von in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen kompetitiv in die DNS eingebaut. [^3H]-Thymidin wurde somit zum ersten selektiven Marker für die DNS-Synthese. Durch Autoradiographie läßt sich das inkorporierte [^3H]-Thymidin photographisch darstellen und quantitativ erfassen [64]. Die Autoradiographiemethode mit [^3H]-Thymidin hat jedoch mehrere Nachteile. Die Radioaktivität ist bei der üblich verwendeten Menge Tritium zwar sehr gering, jedoch beträgt dessen Halbwertszeit mehr als 12 Jahre. Überdies nimmt diese Methode sehr viel Zeit in Anspruch (wochen- bis monatelange Expositionszeiträume) und ist sehr kostenintensiv [54; 53].

Aufgrund dieser Nachteile entwickelte Gratzner (1982) eine vorteilhaftere alternative Methode zum Nachweis proliferierender Zellen: Die Inkorporation und den immunzytochemischen Nachweis von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU). BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon (s. Abb. 3), das in gleicher Weise wie [^3H]-Thymidin dem Thymidinstoffwechsel (Thymidinkinase) unterliegt und in der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv anstelle von Thymidin in die Zell-DNS eingebaut wird (s. Abb. 4). Es leitet sich von Uridin ab, welches anstelle des Thymidins der DNS in der RNS vorkommt.

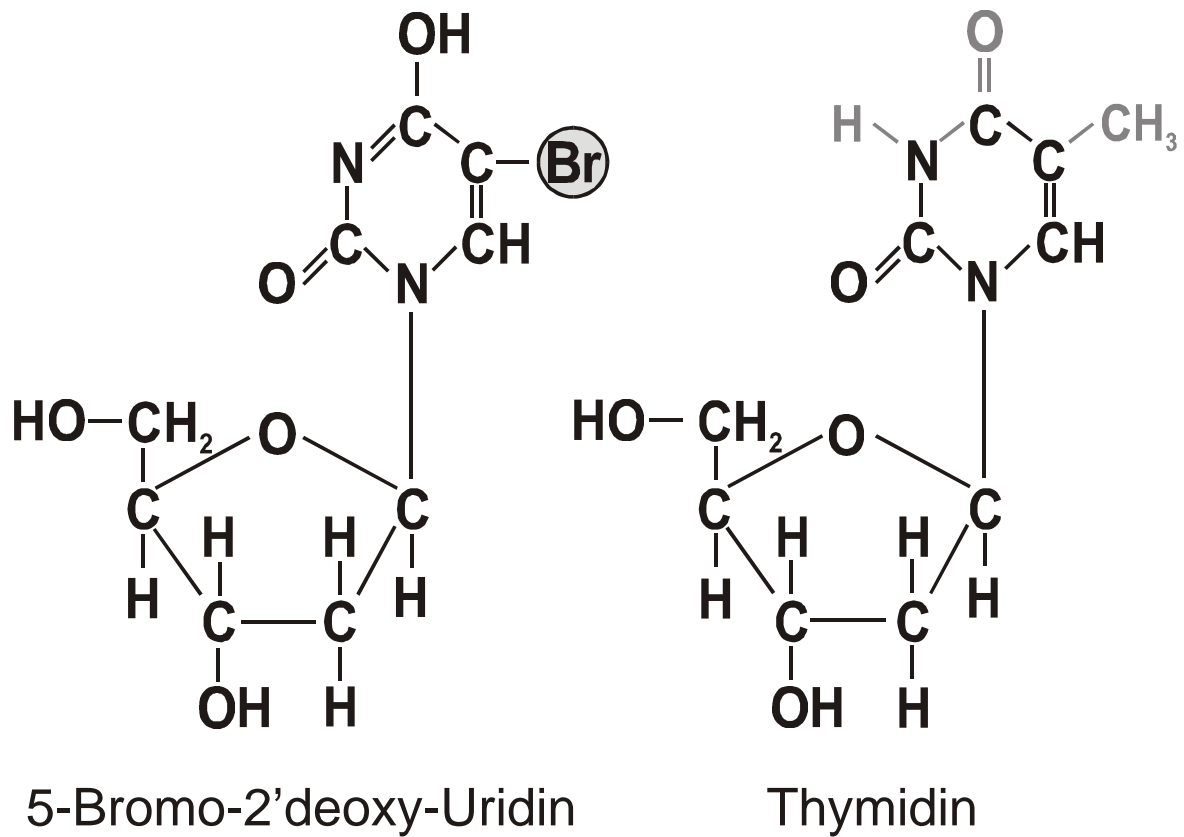
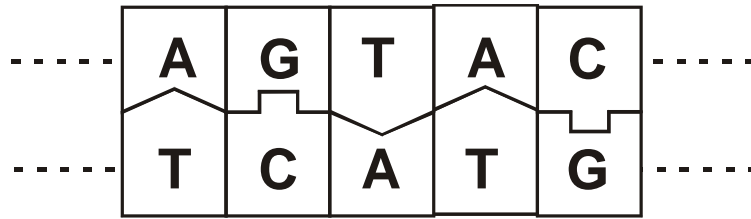
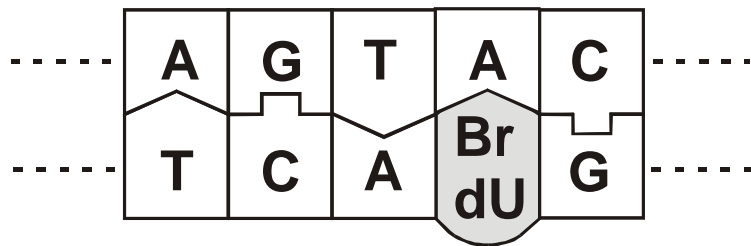


Abb. 3: Strukturformeln von BrdU und Thymidin. Die analogen Moleküle bestehen beide aus einer Desoxyribose und unterscheiden sich lediglich in ihrem Basenrest. Thymidin setzt sich aus einer Desoxyribose und einem Thyminbasenrest zusammen. BrdU besteht aus Desoxyribose mit einem Uridinrest, der an Stelle 5 im Ring einen Bromrest besitzt.



normale DNS



DNS nach BrdU-Einbau

Abb. 4: Schematische Darstellung von Desoxyribonukleinsäure (DNS) ohne und mit Einbau von BrdU. BrdU nimmt kompetitiv den Platz von Thymin in der DNS ein.

BrdU ist nicht radioaktiv und kann (z. B. eine Stunde vor Tötung der Versuchstiere) *in vivo* appliziert werden und mittels monoklonaler Antikörper immunhistochemisch an Gewebsschnitten oder Zellkulturen nachgewiesen werden [21]. Die Dauer des Experiments ist wesentlich kürzer als bei der [^3H]-Thymidin-Methode. Auch die Kosten sind bei der BrdU-Methode weit geringer. BrdU-positive Zellkerne lassen sich außerdem mit der BrdU-Methode viel eindeutiger und weniger aufwendig unter dem Lichtmikroskop mit spezifisch angefärbten Zellen kolokalisieren und photographisch dokumentieren: Alle Zellen, die sich während der BrdU-Expositionszeit in der S-Phase des Zellzyklus befinden, inkorporieren BrdU, und ihr Zellkern läßt sich immunzytochemisch anfärben. Bei einer gleichzeitigen immunzytochemischen Anfärbung des Zytoplasmas auf zellartspezifische Antigene mit einem anderen Farbton läßt sich auf einen Blick die Zellart und Proliferationsaktivität beurteilen und dokumentieren. Dieses Prinzip macht man sich bei einer Doppel-Immunhistochemie zunutze.

Um bei der Immunhistochemie eine ausreichende Aufnahme von Antikörpern ins Gewebe zu gewährleisten, muß der histologische Schnitt möglichst dünn sein, da die Eindringtiefe der Antikörper begrenzt ist. Zweitens muß der Schnitt permeabilisiert und das Zytoskelett aufgelockert werden, damit Anti-BrdU in ausreichendem Maß in den Zellkern und in die DNS gelangen kann.

Bei der Methode mit [^3H]-Thymidin besteht das Problem einer nur sehr schwachen Penetration von β -Strahlung im Gewebe. Das erschwert die Detektion und Auswertung, da somit nur die an der Oberfläche der histologischen Schnitte gelegenen proliferationsaktiven Zellen registriert werden können. Bei übereinstimmenden Resultaten in vergleichenden Studien hat die BrdU-Methode gegenüber der Autoradiographie zahlreiche Vorteile (einfachere Handhabung, weniger Zeit- und Kostenaufwand, Vermeidung von Radioaktivität bei den Experimenten, s.o.) [54; 53].

2.2 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie macht sich die spezifische Bindung von Antikörpern, die gegen bestimmte Gewebs- bzw. Zellantigene gerichtet sind, zunutze. Dabei werden meist mehrere Antikörper nacheinander verwendet: Der primäre Antikörper ist gegen das dazustellende Antigen (z. B. BrdU) gerichtet. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen das F_c-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt worden war. In Abb. 5 ist das Schema der Immunhistochemie dargestellt.

a) Histochemische Darstellung von Mikrogliazellen

Mikrogliazellen können mit *Griffonia simplicifolia* Isolektin B₄ (IB₄) markiert werden, einem Zellmembranprotein aus der Familie der Lektine, das aus der Pflanzenart *Griffonia simplicifolia* gewonnen wird. Es weist eine hohe Bindungsaffinität zu Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), also auch zu Mikrogliazellen, auf. Das in der vorliegenden Studie verwendete IB₄ ist mit Biotinmolekülen konjugiert und kann wie ein biotinylierter Sekundärantikörper mit der ABC-Methode nach Hsu *et al.* (1981) weiterentwickelt werden (s.u.).

b) Immunhistochemische Darstellung von Astrozyten

Der hierfür verwendete Primärantikörper richtet sich gegen glial fibrillary acidic protein (GFAP), ein astrozytenspezifisches Zytoplasmaprotein und Bestandteil des Zytoskeletts. Dieser Antikörper stammt aus dem Kaninchen, deshalb verwendet man einen Sekundärantikörper, der gegen das F_c-Fragment von Kaninchen-Immunglobulinen gerichtet ist.

c) Immunhistochemische Darstellung BrdU-positiver Zellen

In dieser Arbeit wurde eine Mischung von drei verschiedenen in der Maus synthetisierten Primärantikörpern gegen BrdU verwendet. Der biotinylierte Sekundärantikörper ist in diesem Fall gegen Maus-Immunglobulin gerichtet.

d) Die nach Hsu *et al.* modifizierte ABC-Methode

Bei der von Hsu *et al.* (1981) entwickelten sogenannten IBRAB-Technik (indirect bridged avidin-biotin technique) wird nach der Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper nacheinander Avidin und Biotin-assoziierte Peroxidase zugegeben oder zeitsparend als vorgefertigter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) zugefügt.

Avidin ist ein im Hühnereiweiß enthaltenes Glykoprotein (MG 68.000) mit einer sehr hohen Affinität zu dem sehr kleinen Molekül Biotin (=Vitamin H) (Dissoziationskonstante 10^{-15} M). Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin und bildet im Experiment eine Brücke zwischen einem biotinylierten Antikörper und einem Peroxidase-assoziierten Biotinmolekül (sogenannte BRAB-Technik nach Guesdon *et al.*, 1979: Bridged avidin-biotin technique) beziehungsweise zwischen biotinyliertem *Griffonia simplicifolia* Isolektin B₄ und enzymassoziiertem Biotin. Man entwickelt die Präparate schließlich mit einem Substrat des Enzyms Peroxidase, z.B. mit Diaminobenzidin (DAB). Bei der Darstellung der Mikroglia und der Astrozyten wird DAB verwendet, das an den peroxidaseaktiven Stellen des Gewebes mit Wasserstoffperoxid zu einem wasserunlöslichen braunen Produkt reagiert. Bei der BrdU-Immunhistochemie wird die DAB-Lösung mit Nickelammoniumchlorid und Kobaltchlorid angesetzt, was eine blauschwarze Farbreaktion hervorruft. Also ergeben sich im doppelt positiven Fall bei der Doppel-Immunhistochemie braun angefärbte Mikrogliazellen bzw. Astrozyten mit blauschwarzen Zellkernen.

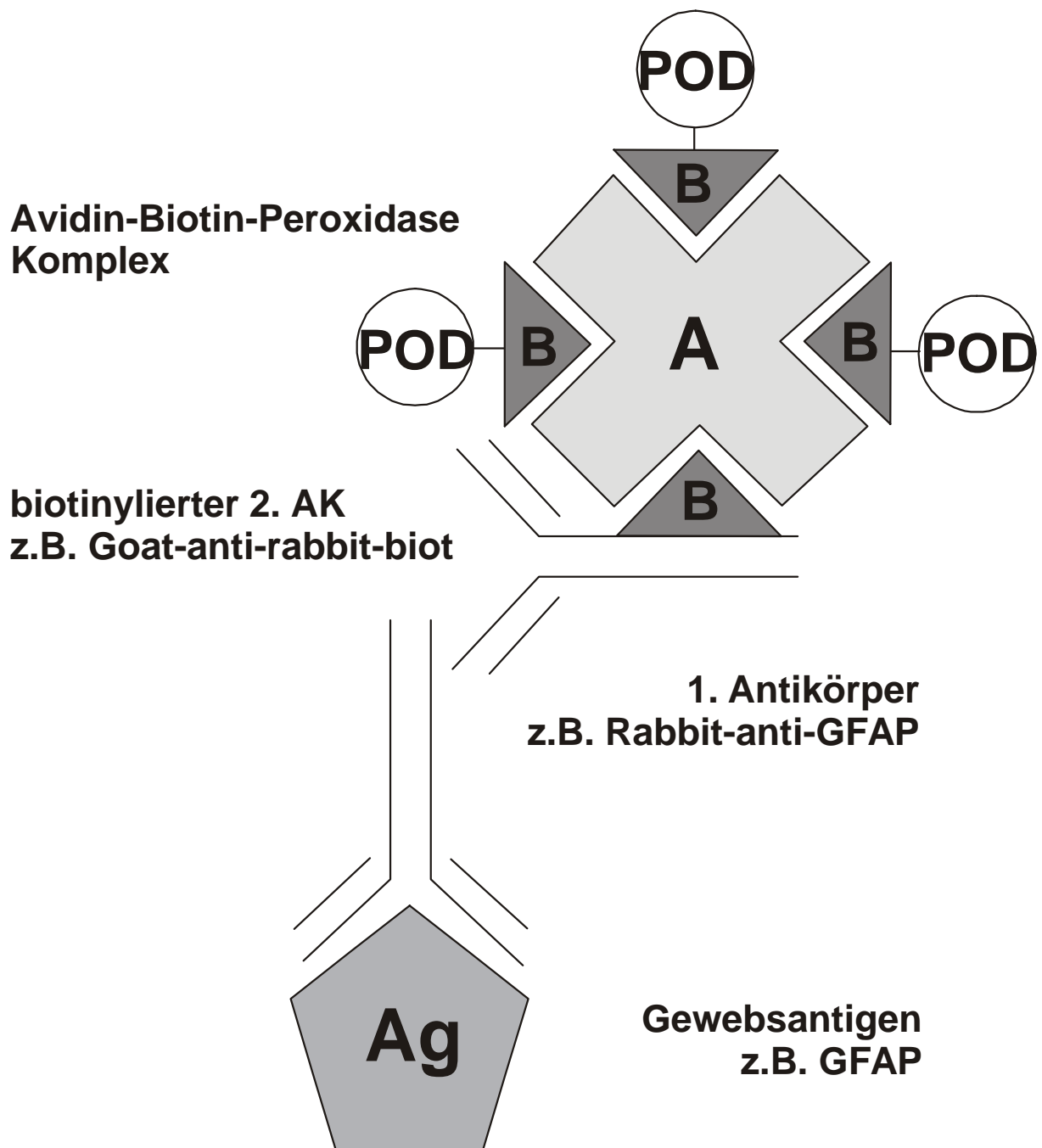


Abb. 5: Modell der Immunhistochemie. Der Primärantikörper (z.B. Rabbit-anti-GFAP) bindet mit seinem F_{ab} -Anteil spezifisch an ein Gewebsantigen (z.B. GFAP). Der biotinylierte Zweitantikörper (z.B. goat-anti-rabbit-biot.) bindet an das F_c -Fragment des aus dem Kaninchen (rabbit) stammenden Erstantikörpers. Zusammen mit dem Biotinrest am F_c -Fragment des Sekundärantikörpers kann sich nun ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) ausbilden, der mit Diaminobenzidin zu einem farbigen Produkt reagieren kann. Auf diese Weise kann man Gewebsantigene (z.B. GFAP) farbig sichtbar machen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

In dieser Studie wurde mit 24 ausgewachsenen männlichen Wistar-Albinoratten (Gewicht: 250-350 g) gearbeitet, die unter Standard-Laborbedingungen gehalten wurden. Die Zucht und Haltung der Tiere sowie die Durchführung der entorhinalen Läsion und die Tötung der Tiere erfolgte im Tierstall des Institutes für Anatomie der Charité Berlin. Die Tiere waren prä- und postoperativ gruppenweise bei einer Raumtemperatur von etwa 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-50% in Käfigen untergebracht. Als Nahrung erhielten die Tiere Preßfutter und Wasser.

3.2 Zusammensetzung des Anästhetikums

20,1 ml des verwendeten Betäubungsmittels enthalten:

- 10 ml Ketanest^R Fa. Parke-Davis
(Ketamin-HCl 50 mg/ml)
- 1,2 ml Rompun^R Fa. Bayer
(Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml)
- 0,5 ml Vetranquil^R Fa. Sanofi-Ceva
(Acepromazinmaleat 13,56 mg/ml, Chlorbutanol 5,00 mg/ml)
- 8,4 ml Aqua ad inj. Fa. Braun

3.3 Zusammensetzung der Fixativflüssigkeit

Ein Liter der für die transkardiale Perfusion und für die Nachfixierung der Gehirne verwendeten Fixativflüssigkeit enthalten:

- 40 g Paraformaldehyd Fa. Merck
- 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer Fa. Merck
- 500 ml Aqua bidest

Diese Rezeptur ergab eine 4% Paraformaldehydlösung in 0,1 M PB mit einem pH-Wert von 7,4.

3.4 Zusammensetzung des verwendeten Puffers

3.4.1 PBS

Beim Schneiden der Gehirne am Vibratom sowie für die Immunhistochemie wurde PBS folgender Zusammensetzung verwendet:

- 2,925 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ Fa. Merck
 - 0,49 g KH_2PO_4 Fa. Merck
 - 16,00 g NaCl Fa. Merck
- ad 2000 ml Aqua bidest.

3.4.2 Spülpuffer

Der Spülpuffer wurde folgendermaßen hergestellt:

- 900 ml PBS
- 1,8 ml Triton 0,1 % Fa. Sigma
- 100 ml Tris-Puffer ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) 0,05 M, pH 7,6 Fa. Merck, Artikel-Nr. 8382

3.5 Chemikalien für die morphologische Untersuchung

3.5.1 Darstellung von Mikroglia

- Isolektin B₄ aus *Griffonia Simplicifolia* (biotinyliert) Fa. Sigma, L 2140
- Avidin-Biotin-Komplex Elite (ABC) Fa. Camon, PK-6100
- 3',3'Diaminobenzidin (DAB) Fa. Sigma, D 5637
- Triton 10% Fa. Sigma, T 8787
- H₂O₂ 30% Fa. Merck
- PBS pH 6,8
- PBS

3.5.2 Darstellung von Astrozyten

Primärantikörper:

- Kaninchen-anti-GFAP, polyklonal Fa. Biotrend, GA 1171

Sekundärantikörper (biotinyliert):

- Ziege-anti-Kaninchen Fa. Vector, BA-1000
- Avidin-Biotin-Komplex Elite (ABC) Fa. Camon, PK-6100
- 3',3'Diaminobenzidin (DAB) Fa. Sigma, D 5637
- Normales Ziegenserum Fa. Vector, S-1000
- Natrium-Acid (NaN₃ 10%) VEB Sprengstoffwerk
Schönbeck
- Triton 10% Fa. Sigma, T 8787
- H₂O₂ 30% Fa. Merck
- PBS

3.6 Chemikalien für die proliferationskinetische Untersuchung

5'-Bromo-2'-deoxyuridin

Fa. Sigma, B 5002

Primärantikörper:

- Maus-anti-BrdU (IgG1), Klon Bu20a

Fa. Dako, M 744 (1:400)

- Maus-anti-BrdU (IgG1), Klon Ilb5

Fa. Monosan, MON 8003
(1:100)

- Maus-anti-BrdU (IgG1), Klon 2B1

Fa. Immunotech, 1517 (1:900)

Sekundärantikörper (biotinyliert):

- Pferd-anti-Maus

Fa. Vector, BA-2000

- Proteinase K

Fa. Sigma P 0390

- Avidin-Biotin-Komplex Elite (ABC)

Fa. Camon, PK-6100

- 3',3'Diaminobenzidin (DAB)

Fa. Sigma, D 5637

- Normales Pferdeserum

Fa. Vector, S-2000

- 2N HCl

Fa. Merck

- PBS

- Nickelammoniumchlorid 1%

Fa. Aldrich, 33,485-5
Milwaukee

- Cobaltchlorid (CoCl₂) 1%

Fa. Sigma, C 2644

- H₂O₂ 30%

Fa. Merck

- PBS

3.7 Einteilung der Versuchstiergruppen

Aus 24 Versuchstieren wurden sechs Gruppen à vier Tieren gebildet:

Gruppe 1: Kontrollgruppe, d. h. Schein-Operation mit Tötung kurz danach

Gruppe 2: Entorhinale Läsion, Tötung nach 3 Tagen

Gruppe 3: Entorhinale Läsion, Tötung nach 7 Tagen

Gruppe 4: Entorhinale Läsion, Tötung nach 10 Tagen

Gruppe 5: Entorhinale Läsion, Tötung nach 30 Tagen

Gruppe 6: Entorhinale Läsion, Tötung nach 100 Tagen

3.8 Versuchsablauf

Abgesehen von den Kontrolltieren wurde an allen Tieren eine einseitige elektrolytische Läsion des entorhinalen Kortex vorgenommen. Die Versuchstiere erhielten 3-100 Tage nach der Läsion Injektionen von BrdU und wurden eine Stunde später durch transkardiale Perfusion getötet. Danach wurden ihre Gehirne untersucht.

3.8.1 Entorhinale Läsion

Für die stereotaktische Operation wurden die Tiere mit 2 ml des oben angeführten ketaminhaltigen Anästhetikums betäubt. Nach dem Aufbohren der Schädelkalotte wurde mittels eines standardisierten Elektrokoagulators nach Kopf (Olympus OMK 1) eine elektrolytische Läsion des entorhinalen Kortex einer Hirnhemisphäre vorgenommen (s. Abb. 6). In diesem Experiment wurde stets der linksseitige EC lädiert. Die Klinge des Koagulationsmessers wurde dabei vertikal bis an die Schädelbasis hinabgesenkt. Es wurden folgende von Lambda gemessene Koordinaten benutzt (nach Paxinos und Watson, 1986): anterior-posterior +1,2 / lateral +3. Ob die entorhinale Läsion vollständig war, konnte man makroskopisch beim Schneiden des Gehirns am Vibratom sowie mikroskopisch beim Vergleich des lädierten entorhinalen Kortex mit dem der unlädierten kontralateralen Hirnhemisphäre überprüfen. Bei den Kontrolltieren hingegen erfolgte keine elektrolytische Läsion, es wurde lediglich die Schädeldecke unter Anästhesie aufgebohrt.

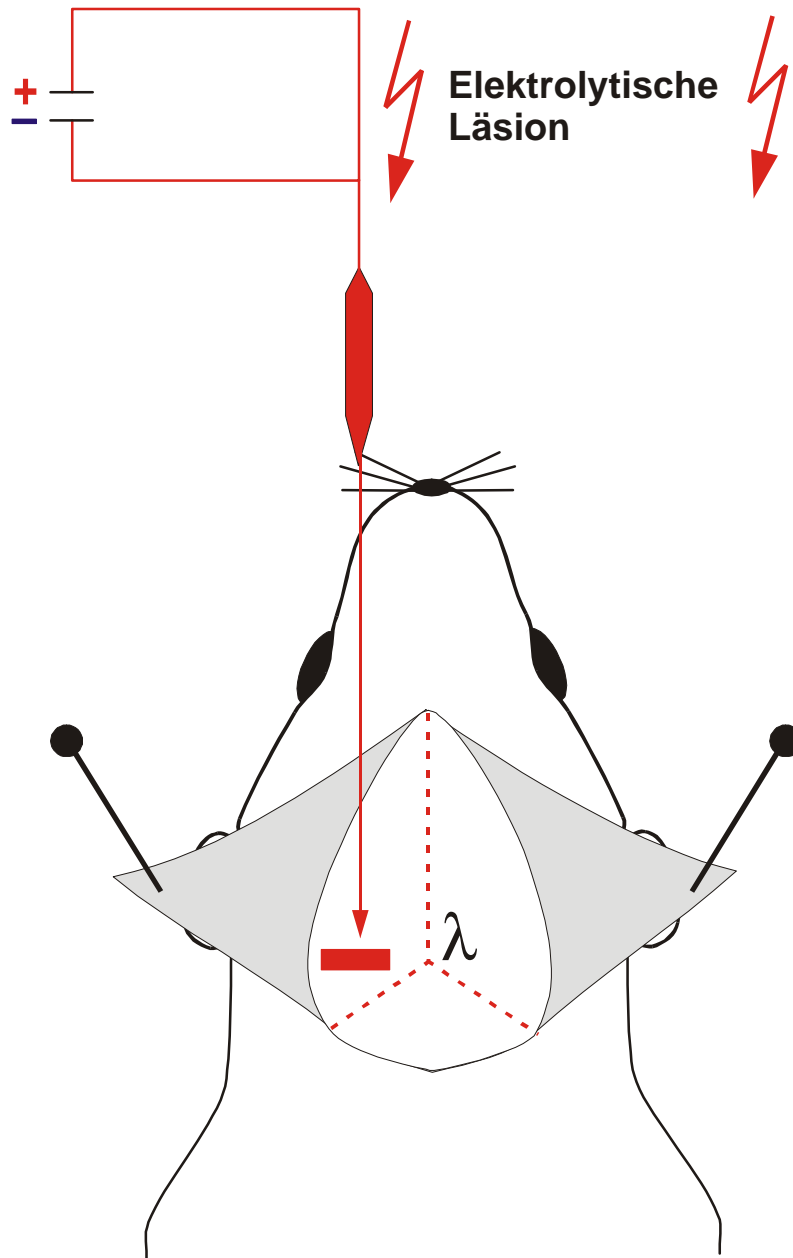


Abb. 6: Operationssitus. Kopf der Ratte mit eröffneter Schädelkalotte bei den ab Lambda gemessenen Koordinaten für den entorhinalen Kortex. λ =Lambda.

3.8.2 Applikation von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin und transkardiale Perfusion

Nach Ablauf der jeweiligen postoperativen Überlebenszeiträume der sechs Versuchstiergruppen bekam jedes Tier 100 mg Bromodeoxyuridin pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Eine Stunde später erhielten die Tiere 2 ml des ketaminhaltigen Anästhetikums. Sie wurden thorakotomiert, und durch die linke Herzkammer wurde ein Perfusionssystem installiert, dessen Kanüle in der *Aorta ascendens* lag. Der rechte Herzvorhof wurde mit der Schere eröffnet, damit die Perfusionsflüssigkeit abfließen konnte. Durch Abklemmen der Bauchaorta konnte man die Perfusion auf die obere Körperhälfte beschränken. Jedes Tier wurde mit ca. 150 ml isotoner Kochsalzlösung (Fa. Fresenius) entblutet. So wurde das Gefäßsystem von für das Experiment hinderlichen Blutbestandteilen gereinigt. Anschließend wurden die Tiere mit ca. 400 ml der paraformaldehydhaltigen Fixativflüssigkeit perfundiert. Die Gehirne wurden aus den Schädeln entfernt und über Nacht in Paraformaldehydlösung nachfixiert. Darauf wurden sie mit einem Vibratom in 60 µm dicke horizontale Scheiben geschnitten.

3.8.3 Immunhistochemie

Um Zellkerne, die BrdU enthalten, darzustellen und diese mit Mikrogliazellen (IB₄) bzw. Astrozyten (GFAP) zu kolokalisieren, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt.

Der für die Mikrogliauntersuchungen bestimmte Teil der Hirnschnitte wurde mit IB₄ und mit gegen BrdU gerichteten Antikörpern doppelgefärbt, der andere Teil mit Antikörpern gegen den Astrozytenmarker GFAP und Antikörpern gegen BrdU. Dazu wurde die nach Hsu *et al.* (1981) modifizierte ABC-Methode angewandt (s. 2.2). Die Darstellung der Mikrogliazellen bzw. der Astrozyten erfolgte zeitlich vor der BrdU-Immunhistochemie. Während der gesamten Histochemie flottierten die Hirnschnitte frei in mit Reagens gefüllten Schälchen.

a) Darstellung von Mikroglia durch *Griffonia simplicifolia* Isolektin B₄

Die Hirnschnitte wurden für 24 Stunden in biotinyliertem IB₄ (1:20), Triton (1:200) und PBS (pH 6,8) bei 4°C inkubiert. Nach drei zehnminütigen Spülgängen mit dem unter 3.4.2 beschriebenen Spülpuffer erfolgte eine Inkubation in Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Reagens A 1:52 und Reagens B 1:52 in PBS) für zwei Stunden. Es folgten weitere Spülungen, bevor die markierten Mikrogliazellen bei fünf- bis zehnminütiger Inkubation in einer DAB-Lösung (0,05% 3',3'Diaminobenzidin und 0,001% H₂O₂ in PBS) braun angefärbt wurden.

b) Immunhistochemische Darstellung von GFAP

Für die Darstellung von Astrozyten wurden die Hirnschnitte zunächst für 30 Minuten mit normalem Ziegenserum (NGS, 1:10 in PBS) behandelt, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Dann wurden die Schnitte für 48 Stunden bei 4°C dem vom Kaninchen stammenden Primärantikörper gegen GFAP (1:1000), mit Natrium-Azid (1:100), NGS (1:100) und Triton (1:200) in PBS, ausgesetzt. Nach einem Spülvorgang wurden die Schnitte für zwei Stunden bei 4°C im biotinylierten Sekundärantikörper, der gegen Kaninchenantigene gerichtet war (1:250), Triton (1:200) und PBS inkubiert. Nach dem nächsten Spülgang folgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und danach die Detektion der Astrozyten mittels DAB-Lösung.

c) Immunhistochemische Darstellung von BrdU

Nach der histochemischen Anfärbung der Mikrogliazellen bzw. der Astrozyten wurde die zweite Immunfärbung durchgeführt, um nachzuweisen, ob die DAB-markierten Gliazellen zur Proliferation angesetzt und somit BrdU inkorporiert hatten. Hierfür wurden die Schnitte in 2N Salzsäure für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, dann gespült und für 25-30 Minuten bei 4°C einer 0,03% Proteinase K-Lösung in PBS ausgesetzt, ehe erneut gespült wurde. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit normalem Pferdeserum (1:10) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt, und ohne

Spülgang wurden sie mit dem ersten Antikörper Maus-anti-BrdU (Dako 1:400, Monosan 1:100, Immunotech 1:900) in PBS bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum gespült, und darauf folgte bei 4°C die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der gegen Masantigene gerichtet war (1:250), Triton (1:200) und PBS. Nach dem nächsten Spülvorgang erfolgte die oben beschriebene zweistündige Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, danach noch ein Spülgang und schließlich die Anfärbung der BrdU-positiven Zellkerne in einem schwarzblauen Farbton mit Nickel-DAB-Lösung (0.05% 3',3' DAB, 0.02% Nickel-Ammonium-Chlorid, 0.024% Kobalt-Chlorid und 0.001% H₂O₂) für zwei bis vier Minuten. Schließlich wurden Präparate gewonnen, auf denen Mikrogliazellen bzw. Astrozyten braun angefärbt waren, und proliferierende Zellen waren mit einem blauschwarzen Zellkern erkenntlich. Die Hirnschnitte wurden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, entwässert in einer aufsteigenden Alkoholreihe, die mit jeweils drei Minuten Verweilzeit vom 60% Alkohol über 70%, 80%, 96% Alkohol bis zum Xylol führte, mit Entellan (Merck, 7961) eingedeckelt und unter dem Lichtmikroskop untersucht.

d) Negativkontrolle ohne Primärantikörper gegen BrdU

Zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, indem man bei der immunhistochemischen BrdU-Färbung auf den Primärantikörpercocktail verzichtete. Alle anderen Färbeschritte liefen dabei in analoger Weise ab. Dabei zeigte sich bei den Negativkontrollschnitten keine charakteristische Farbreaktion. Eine unspezifische Anfärbung von Gewebe durch die übrigen Reagenzien war somit ausgeschlossen.

3.9 Morphologische und proliferationskinetische Auswertung

3.9.1 Gesichtsfelder

Für die Auswertung wurde ein Mikroskop der Marke Olympus verwendet. Die Auszählung wurde bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. In jedem Hirnschnitt wurde der *Gyrus dentatus* sowohl der lädierten als auch der unlädierten Seite in sechs Gesichtsfelder unterteilt (s. Abb. 7), um nach der Auswertung von einer möglichst großen Anzahl an Einzelwerten auszugehen. Jedes Gesichtsfeld hatte einen Durchmesser von etwa 0,8 mm, wobei ein Ausschnitt aus dem gesamten *Gyrus dentatus* mit Molekularschicht und Körnerzellschicht zu überblicken war.

3.9.2 Auswertungskriterien und Auszählung der Gesichtsfelder

Zur Auswertung eigneten sich nur Präparate, bei denen beide Hippokampi intakt waren und sich auf beiden Seiten problemlos sechs Gesichtsfelder abgrenzen ließen. In die Zählungen wurden nur Zellen einbezogen, die in der Schnittebene in ihrem Zelleib getroffen waren, bei denen also ein potentiell BrdU-positiver Zellkern zu sehen gewesen wäre. Als BrdU-positiv galten alle Zellen, bei denen man eine deutliche blauschwarze Anfärbung ihres Zellkernes erkennen konnte (s. Abb. 8).

In jedem Gesichtsfeld wurden erstens alle Mikrogliazellen bzw. Astrozyten ausgezählt. Zweitens die Anzahl der doppelt positiv angefärbten Zellen, die braun als Gliazellen gekennzeichnet waren und zugleich einen blauschwarzen Zellkern als Nachweis einer Inkorporation von BrdU und somit eines stattgefundenen Eintritts in die S-Phase des Mitosezyklus aufwiesen. Die Auszählungen erfolgten dabei für die äußere und innere Molekularschicht sowie für die Körnerzellschicht der *Gyrus dentatus* getrennt. Bei unlädierten Kontrolltieren sowie auf der zur Läsion kontralateralen Hirnseite bei lädierten Tieren ließ sich die äußere von der inneren Molekularschicht meist nicht eindeutig abgrenzen, so daß in diesen Fällen lediglich Werte für die gesamte Molekularschicht ermittelt wurden.

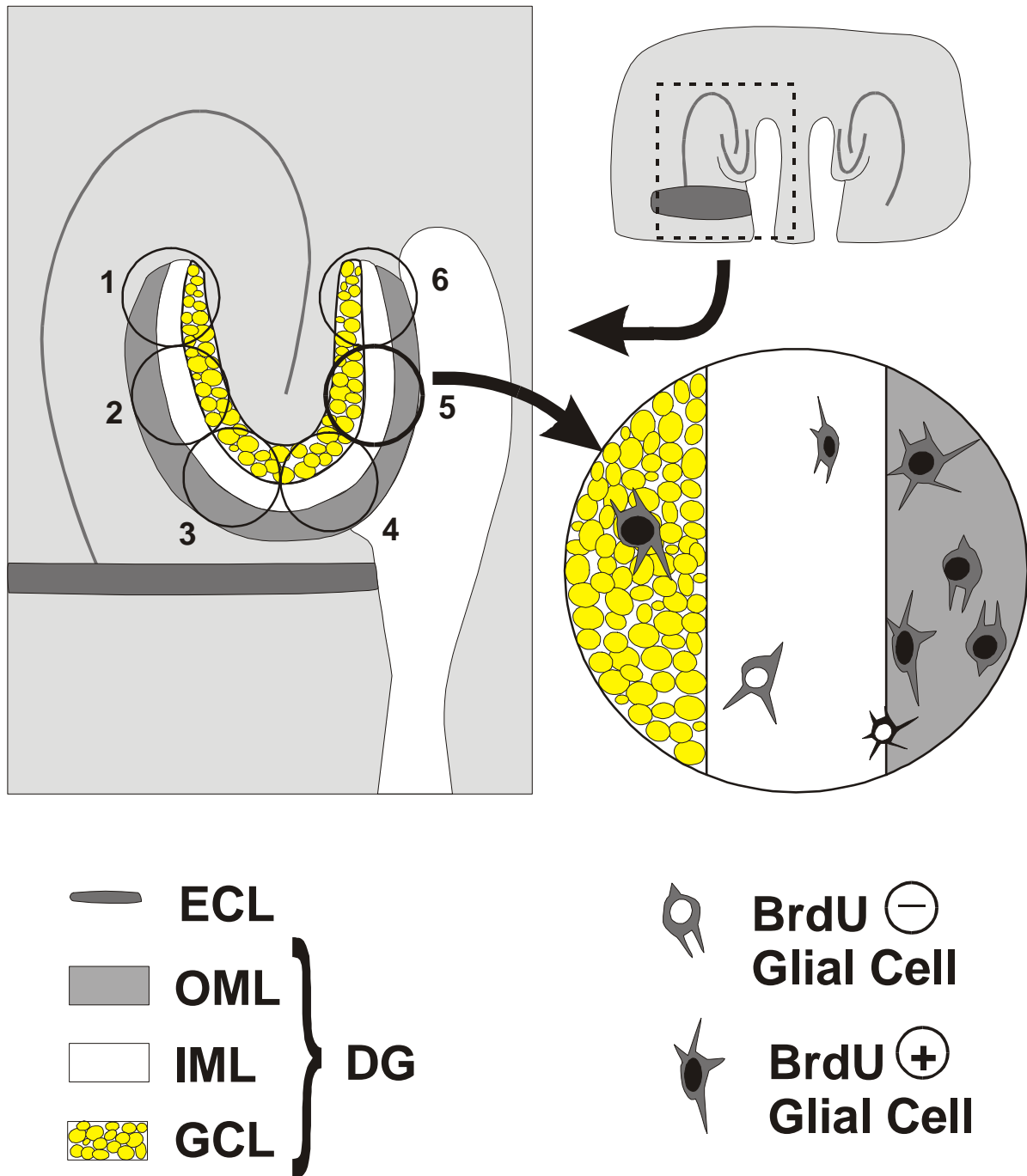


Abb. 7: Methode der Zellzählung. Unterteilung des *Gyrus dentatus* (DG), hier auf der lädierten Seite, in sechs Gesichtsfelder. Separate Auszählung der gesamten Gliazellen und der BrdU-positiven Gliazellen in der äußeren (OML) und inneren (IML) Molekularschicht sowie der Körnerzellschicht (GCL). ECL=entorhinale Kortextläsion. In der Vergrößerung sind BrdU-positive und BrdU-negative Gliazellen am Zellkern zu erkennen.

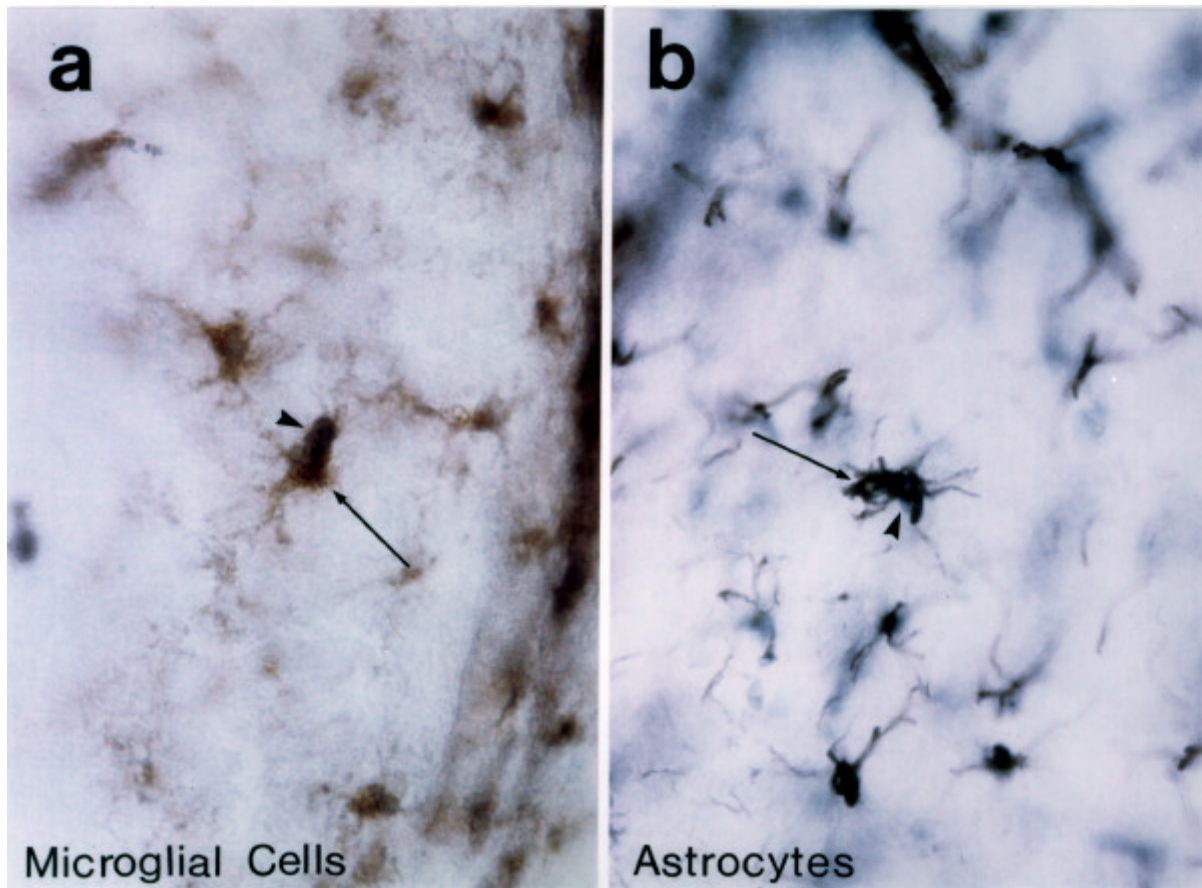


Abb. 8: Beispiel für doppelt positiv angefärbte Gliazellen. **a:** IB₄- und BrdU-positive Mikrogliazellen in der äußeren Molekularschicht des ipsilateralen *Gyrus dentatus* drei Tage nach Läsion, **b:** GFAP- und BrdU-positive Astrozyten in der äußeren Molekularschicht des ipsilateralen *Gyrus dentatus* sieben Tage nach Läsion. Lange Pfeile: Zelleib; kurze Pfeile: Zellkern. Vergrößerung: x 100.

3.10 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel bzw. Star Calc erfaßt. Die Zellzahl, die Anzahl doppelgefärbter Zellen und der Labeling Index (LI, Verhältnis der Anzahl doppelgefärbter Zellen zur Gesamtzellzahl, s. 4.1.2 c) der einzelnen Stadien wurden mit der Kontrolle verglichen. Außerdem erfolgte bei allen lädierten Stadien ipsilateral ein Vergleich der äußeren (OML) mit der inneren Molekularschicht (IML). Mit Hilfe des Statistikprogrammes Statview wurden die Daten zunächst per Kolmogoroff-Smirnoff-Normalverteilungstest untersucht. Da nicht alle Daten normalverteilt waren, erfolgte die statistische Auswertung durch den nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test.

4. ERGEBNISSE

In den scheinoperierten Gehirnen und auf der unlädierten Seite der lädierten Hirne war die Molekularschicht im *Gyrus dentatus* des Hippokampus homogen durchfärbt. Innere und äußere Molekularschicht ließen sich nicht voneinander abgrenzen. Bei den operierten Tieren konnte man dagegen ipsilateral zur Läsion die innere und äußere Molekularschicht leicht unterscheiden, da die äußere Molekularschicht, möglicherweise aufgrund von Beschädigungen des Gewebes, kräftiger dunkel angefärbt war.

In der Umgebung der Läsion erschien das Gewebe zerrissen und war stark immunreaktiv für aktivierte Mikroglia. In späten Stadien glich das Gewebe einer Glianarbe, verursacht durch gliotische Astrozyten. Um die Läsion herum waren BrdU-positive, proliferierende Zellen zu beobachten, so daß man hier überprüfen konnte, ob die BrdU-Färbung gelungen war. Nach der Auszählung der Gliazellen wurden die erhaltenen Daten proliferationskinetisch und statistisch ausgewertet.

4.1 Untersuchungen an Mikrogliazellen

4.1.1 Beschreibung der histologischen Präparate

a) Kontrollstadium (Versuchstiergruppe 1)

In den Mikrogliapräparaten der Kontrollgruppe ohne Läsion wiesen beide Hippokampi im *Gyrus dentatus* eine homogen gefärbte Molekularschicht auf. Dabei waren IB₄-markierte Mikrogliazellen in den unlädierten Hirnen relativ selten anzufinden: Die Zellen waren vereinzelt, schwach gefärbt und ramifiziert, d.h. sie hatten dünne, verzweigte Fortsätze ausgebildet, wie man es bei inaktiver, ruhender Mikroglia beobachten kann. BrdU-positive Mikrogliazellen waren nur äußerst selten zu registrieren.

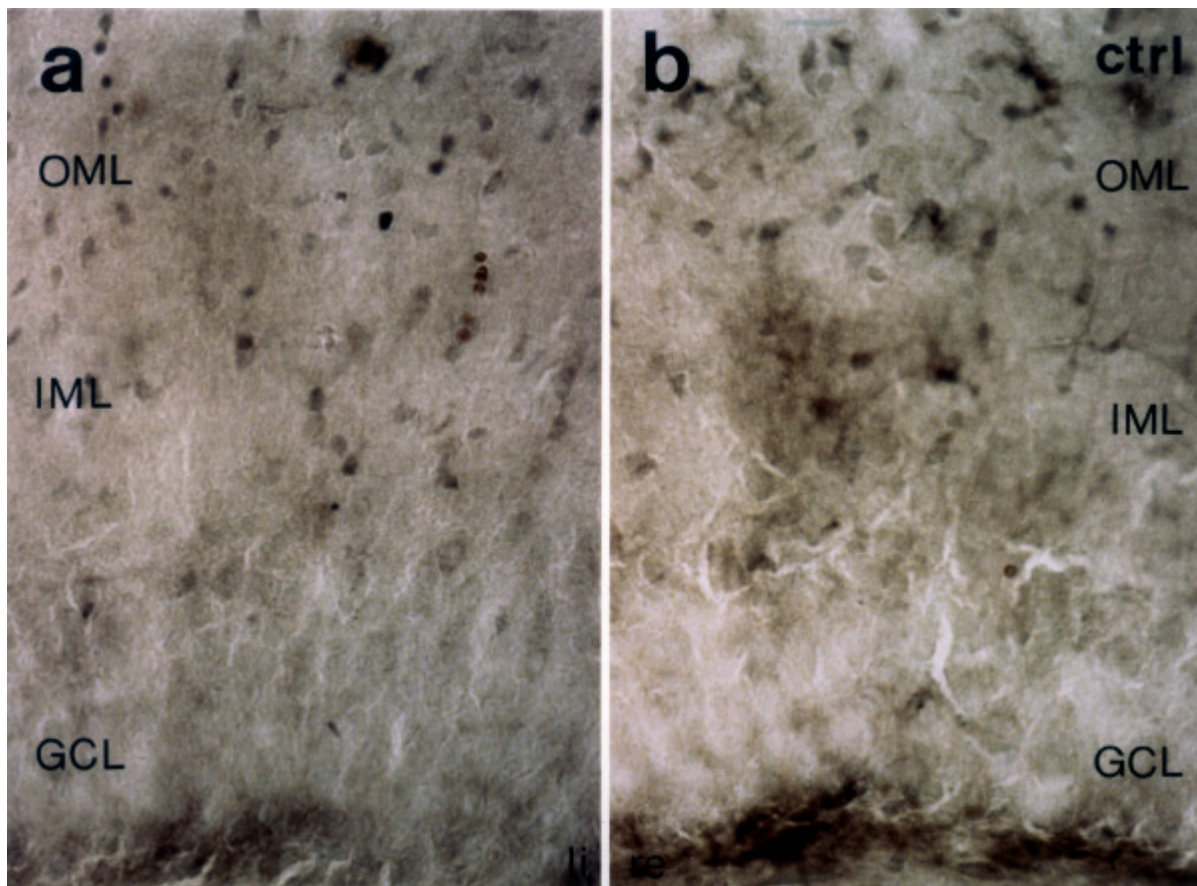


Abb. 9: Mikroglia-Kontrollstadium ohne entorhinale Läsion, linker-rechter Hippokampus. Überwiegend schwächer angefärbte, ramifizierte Mikrogliazellen. Das Gewebe weist kaum Zeichen der Proliferation auf. Vergrößerung: x 40.

b) Tag 3 nach Läsion (Versuchstiergruppe 2)

Drei Tage nach Läsion zeigten sich in der deutlich abgrenzbaren äußeren Molekularschicht eine größere Anzahl dunkelbraun gefärbter Mikrogliazellen. Diese Zellen besaßen zwar Fortsätze, erschienen aber gegenüber den Zellen im kontralateralen Hippokampus oder im Kontrollstadium schon stark verdickt und gerundet, wie bei aktivierter Mikroglia. Viele doppelt gefärbte, BrdU-positive Mikrogliazellen mit blauschwarzen Zellkernen waren zu verzeichnen (s. 3.9.2, Abb. 8).

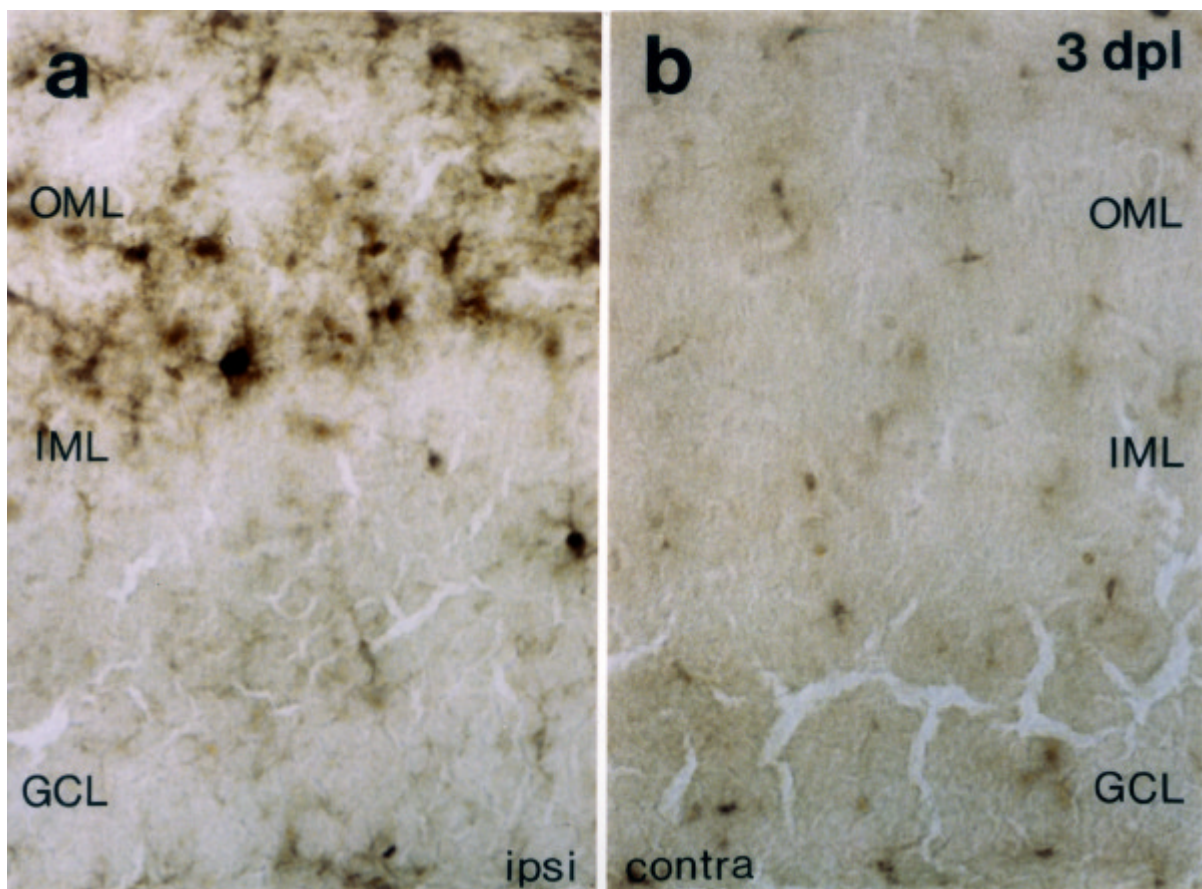


Abb. 10: Mikroglia 3 dpl, ipsilateral-kontralateral. Ipsilateral deutlich gefärbte Mikrogliazellen besonders in der äußeren Molekularschicht, zahlreiche BrdU-positive Zellkerne. Kontralateral wenige, schwach angefärbte Mikrogliazellen. Vergrößerung: x 40.

c) Tag 10 nach Läsion (Versuchstiergruppe 4)

Am zehnten postläsionalen Tag war ein äußerer und innerer Anteil der ipsilateralen Molekularschicht ebenfalls klar voneinander abgrenzbar. Es waren zahlreiche dunkelbraun angefärbte, morphologisch verdickte Mikrogliazellen in der ipsilateralen Molekularschicht zu sehen, jedoch deutlich weniger proliferierende Zellen als drei Tage nach Läsion.

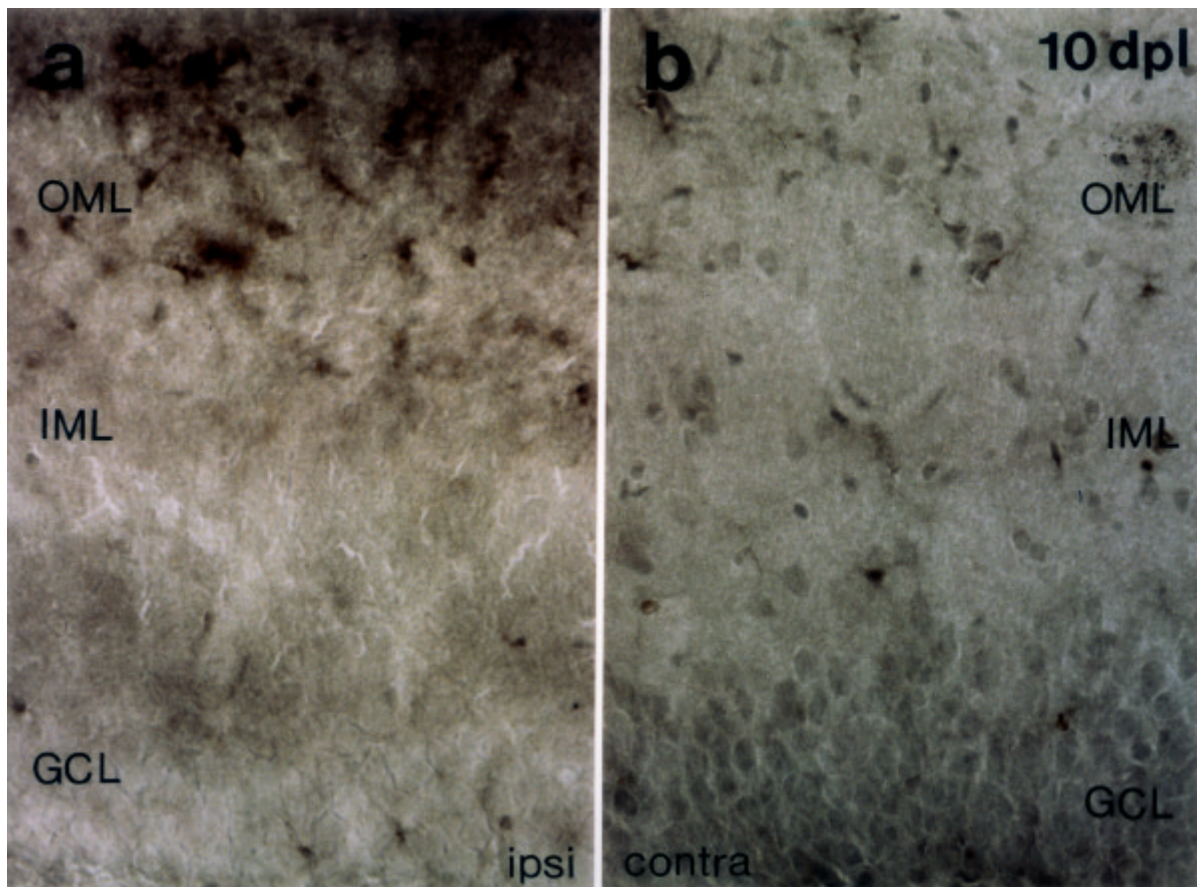


Abb. 11: Mikroglia 10 dpl, ipsilateral-kontralateral. Ipsilateral zahlreiche stark gefärbte Mikrogliazellen. Vergrößerung: x 40.

d) Tag 30 nach Läsion (Versuchstiergruppe 5)

Nach 30 Tagen konnte man auf der lädierten Seite immer noch die äußere und innere Molekularschicht voneinander unterscheiden. Mikrogliazellen waren im ipsilateralen Hippokampus zahlenmäßig etwas häufiger und auch stärker braun angefärbt und morphologisch stärker verdickt als kontralateral, BrdU-positive Mikrogliazellen fanden sich nur ganz vereinzelt.

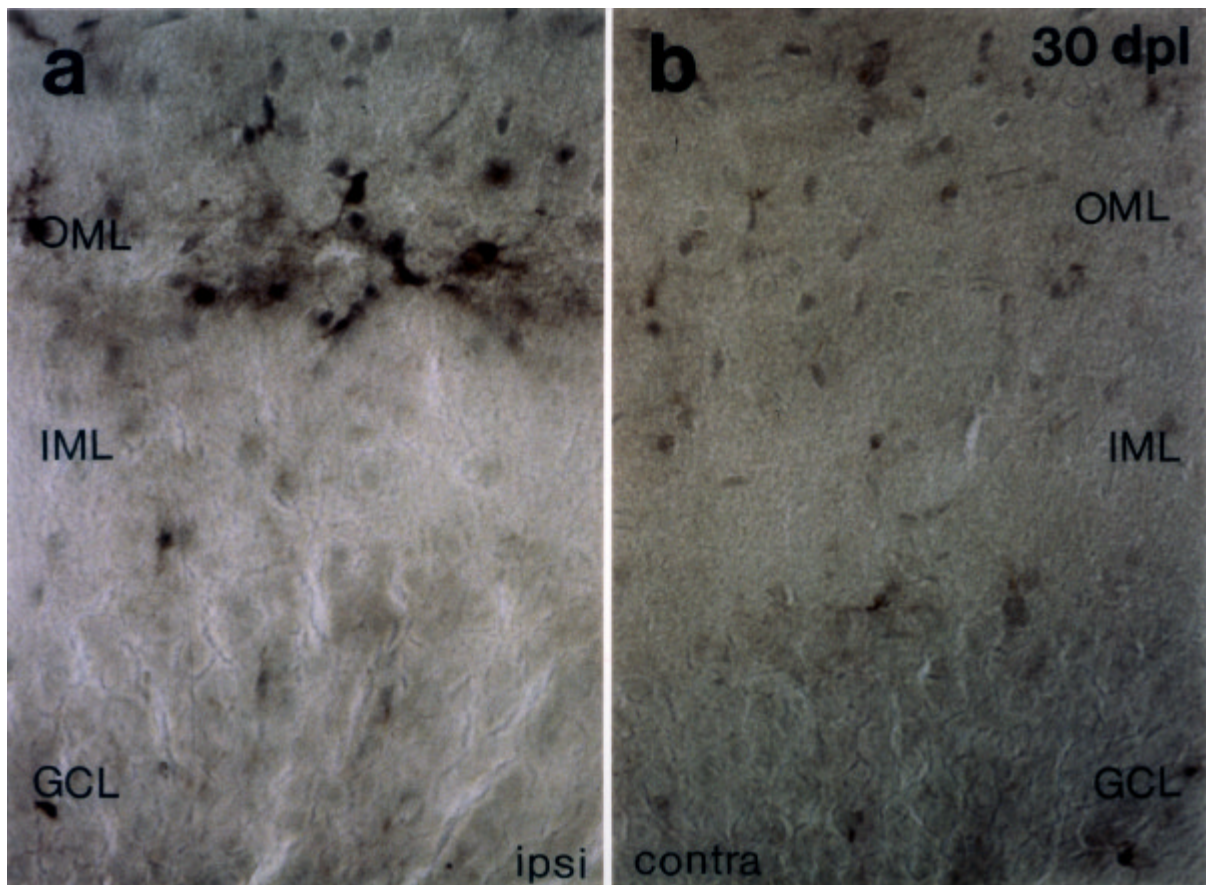


Abb. 12: Mikroglia 30 dpl, ipsilateral-kontralateral. Ipsilateral in der Molekularschicht deutlich angefärbte Mikrogliazellen. Vergrößerung: x 40.

4.1.2 Zellzählung und proliferationskinetische Auswertung bei der Mikroglia

a) Mikrogliazellzahlen nach entorhinaler Läsion

Drei Tage nach Läsion betrug die Anzahl der Mikrogliazellen in der ipsilateralen Molekularschicht des *Gyrus dentatus* 78,3 pro Gesichtsfeld (Gf). Verglichen mit den Kontrollwerten der unlädierten Tiere (13,3/Gf in der linken ML) ist das eine signifikante Erhöhung ($p < 0,005$, s. Abb. 13a). Auf der kontralateralen Seite wurden 25,8 Mikrogliazellen/Gf gezählt, was sich ebenfalls signifikant von den Kontrollwerten (13,1/Gf rechts) unterschied ($p < 0,005$). Auch in der GCL war die ipsi- und kontralaterale Mikrogliazellzahl signifikant erhöht ($p < 0,005$): 12,8/Gf ipsi- und 12,6/Gf kontralateral der Läsion, gegenüber den Kontrollwerten von 2,2/Gf im linken und 2,4/Gf im rechten DG.

Zehn Tage nach Läsion erschien die Gesamtzahl der Zellen in ML und GCL bereits reduziert im Vergleich zum Dreitagesstadium, war jedoch immer noch signifikant erhöht ($p < 0,005$). In der ipsilateralen ML waren es 49,2 Mikrogliazellen/Gf, kontralateral 20,4; in der GCL 7,1/Gf ipsilateral und 5,7/Gf kontralateral.

Die Mikroglia-Zellzahl 30 Tage nach Läsion war in der ML noch etwas mehr zurückgegangen, wenn auch immer noch beiderseits signifikant erhöht ($p < 0,005$). Die Zellzahl pro Gesichtsfeld in der ipsilateralen ML (37,6/Gf bei 27 in der OML und 10 in der IML) näherte sich wieder etwas den Werten der kontralateralen ML (21,1) an. In der GCL waren die Zellzahlen gegenüber zehn Tagen nach Läsion leicht angestiegen und ebenfalls noch signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht ($p < 0,005$), ipsilateral 7,9/Gf und kontralateral 8,7/Gf (s. Abb. 13a).

b) Zahl proliferierender Mikrogliazellen nach entorhinaler Läsion

Die Zahl der BrdU-positiven Mikrogliazellen (s. Abb. 13b) war drei Tage nach Läsion besonders hoch in der ipsilateralen OML (12,7/Gf), lag in der gesamten ML ipsilateral bei 14,5/Gf und kontralateral bei 1,0/Gf. In der GCL betrugen die Werte 0,8/Gf ipsi- und 0,1/Gf kontralateral. Die für ipsilateral zur Läsion ermittelten Werte

waren sowohl in der ML als auch in der GCL signifikant erhöht ($p < 0,005$) im Vergleich mit den Kontrollen (0,6/Gf in der ML und 0,0/Gf in der GCL links). In der rechten Hirnhemisphäre betrugen die Kontrollwerte 0,5/Gf in der ML und 0,1/Gf in der GCL.

Nur 1,1 Mikrogliazellen/Gf waren zehn Tage nach Läsion in der ipsilateralen OML wie auch in der gesamten ML BrdU-positiv. In der kontralateralen ML waren es noch weniger: 0,1/Gf. Für die GCL betrugen die Werte 0/Gf ipsi- und 0,1/Gf kontralateral zur Läsion.

30 Tage nach Läsion waren praktisch keine proliferierenden Mikrogliazellen mehr nachzuweisen (ipsilateral 0,4/Gf in der ML und 0/Gf in der GCL, kontralateral 0,1/Gf in der ML und 0/Gf in der GCL).

c) Der Labeling Index als Marker der Proliferationsquote von Mikrogliazellen

Um das Verhältnis proliferierender Zellen zur Gesamtmenge Zellen zu veranschaulichen, wurden aus den bereits statistisch gewonnenen Zellzahl-Mittelwerten Quotienten gebildet. Man bezeichnet den Wert, den man bei der Division der Anzahl BrdU-positiver Mikrogliazellen durch die Gesamtzahl der Mikrogliazellen erhält, als "Labeling Index" oder Färbeindex:

$$LI = n(IB_4^+ BrdU^+) / n(IB_4^+)$$

Drei Tage nach Läsion (s. Abb. 13c) war der LI in der ipsilateralen OML relativ hoch (21,5%). In der IML betrug er 9,1%. In der ipsilateralen Gesamt-ML (LI=18,6%) und in der GCL (LI=6,2%) war der LI immer noch höher als kontralateral (ML 4%; GCL 0,8%).

Zehn Tage nach Läsion ergab der LI in der ipsilateralen OML 2,7%. In der gesamten ML waren ipsilateral 2,2%, kontralateral 0,5% der Mikrogliazellen doppelgefärbt. In

der ipsilateralen GCL (LI=0%) befanden sich praktisch keine doppelgefärbten Zellen, die kontralaterale GCL hatte einen LI von 1,2%.

30 Tage nach Läsion waren die Labeling Indices niedrig ähnlich wie Tag 10 nach Läsion: ipsilateral 1,4% in der äußeren und 0,5% in der inneren Molekularschicht, in der gesamten ML 1,2% ipsi- und 0,5% kontralateral. Es gab keine proliferierenden Zellen in der GCL auf beiden Seiten, so daß die LI-Werte wegen unzulässiger Division durch Null nicht errechnet werden konnten.

Bei den unlädierten Kontrolltieren wurden LI-Werte von links 4,8% (ML) und 1,5% (GCL), rechts 3,6% (ML) und 5,6% (GCL) ermittelt.

d) Vergleich der Mikroglia proliferationsaktivität ipsi- und kontralateral zur entorhinalen Läsion

Drei Tage nach Läsion ergab sich bei der Division der Zahlen von BrdU-positiven Mikrogliazellen in der ML ipsilateral geteilt durch kontralateral eine Quote von 14,1. Das bedeutet, die Zahl doppelgefärbter Zellen in der ipsilateralen ML war um den Faktor 14,1 höher als in der kontralateralen ML. In der GCL ergab sich ein Wert von 8, d.h. ipsilateral wurde eine 8-fach höhere Zahl proliferierender Zellen gefunden als kontralateral.

Zehn Tage nach Läsion ergab sich eine Quote von 11 für die ML und für die GCL bei fehlender ipsilateraler Proliferation der Wert 0. 30 Tage nach Läsion war bei der ML das Verhältnis ipsi- zu kontralateral 4,3. Bei der GCL konnte es aufgrund der unzulässigen Division durch Null nicht ermittelt werden. Aus den Kontrollwerten ließ sich ein Quotient aus der Zahl proliferierender Zellen in der ML bzw. GCL links geteilt durch rechts ermitteln (ML 1,4, GCL 0,2).

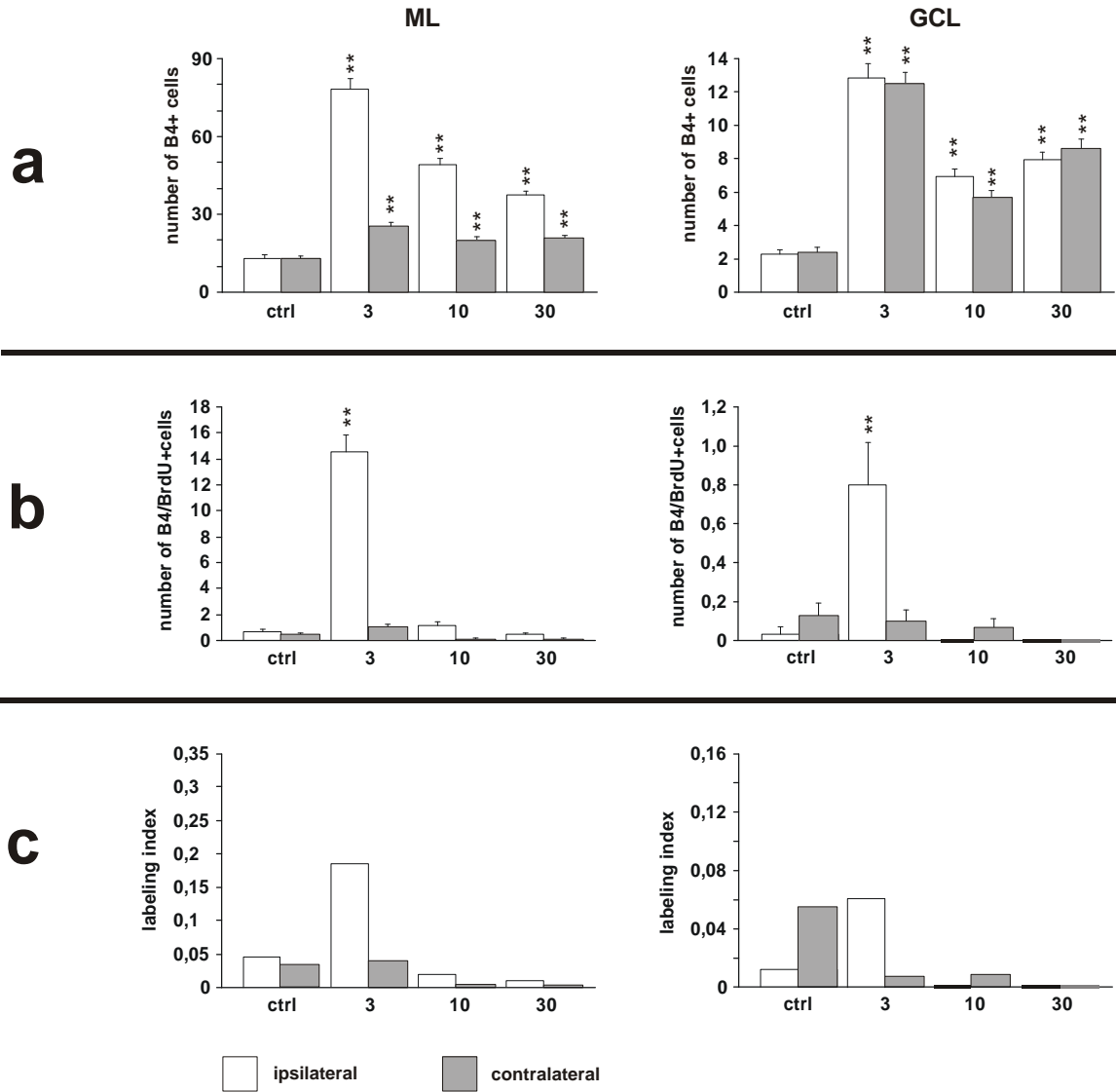


Abb. 13: Statistische Auswertung der Zellzahlen und Proliferationsraten von Mikrogliazellen in den Molekularschichten (ML) und Körnerzellschichten (GCL) beider Hirnhemisphären. **a:** Mikrogliazellzahlen. **b:** Anzahlen BrdU-positiver, also doppelgefärbter Mikrogliazellen. **c:** Labeling indices, ermittelt durch die Anzahlen BrdU-positiver Mikrogliazellen dividiert durch die Gesamtzellzahlen von Mikrogliazellen. Sternchen auf den Säulen repräsentieren die Signifikanz der Daten, im Vergleich mit den Kontrollwerten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).

4.2 Untersuchungen an Astrozyten

4.2.1 Beschreibung der histologische Präparate

a) Kontrollstadium (Versuchstiergruppe 1)

Auch bei den Astrozytenpräparaten war die Molekularschicht beider Hippokampi bei den unlädierten Kontrolltieren homogen gefärbt, so daß eine lichtmikroskopische Unterscheidung der inneren und äußeren Molekularschicht nicht möglich war. Die mit anti-GFAP detektierten Astrozyten waren gleichmäßig verteilt, sie zeigten zarte, dünne Fortsätze und eine dezente, aber deutliche Braunfärbung. Wenige Zellen waren doppelt immunoreaktiv für sowohl GFAP als auch BrdU.

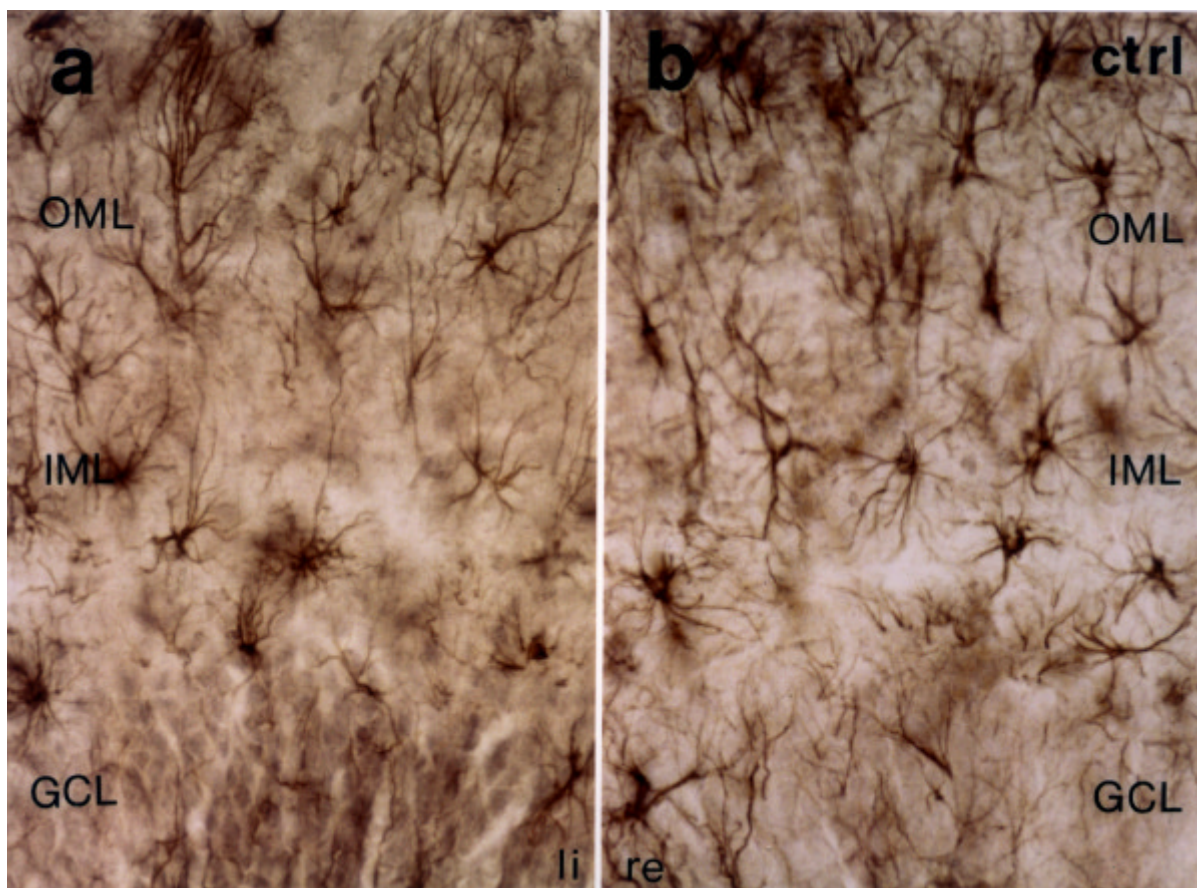


Abb. 14: Astrozyten-Kontrollstadium ohne entorhinale Läsion, linker-rechter Hippokampus. Gleichmäßig verteilte, braun gefärbte Astrozyten mit zarten Fortsätzen in beiden Hirnhälften. Vergrößerung: x 40.

b) Tag 3 nach Läsion (Versuchstiergruppe 2)

Am dritten Tag nach entorhinaler Läsion waren ipsilateral im Hippokampus die innere und äußere Molekularschicht unterscheidbar, kontralateral dagegen nicht. Die Astrozyten schienen auf beiden Hirnseiten ähnlich konfiguriert, auch gab es nur wenige BrdU-positive Zellen.

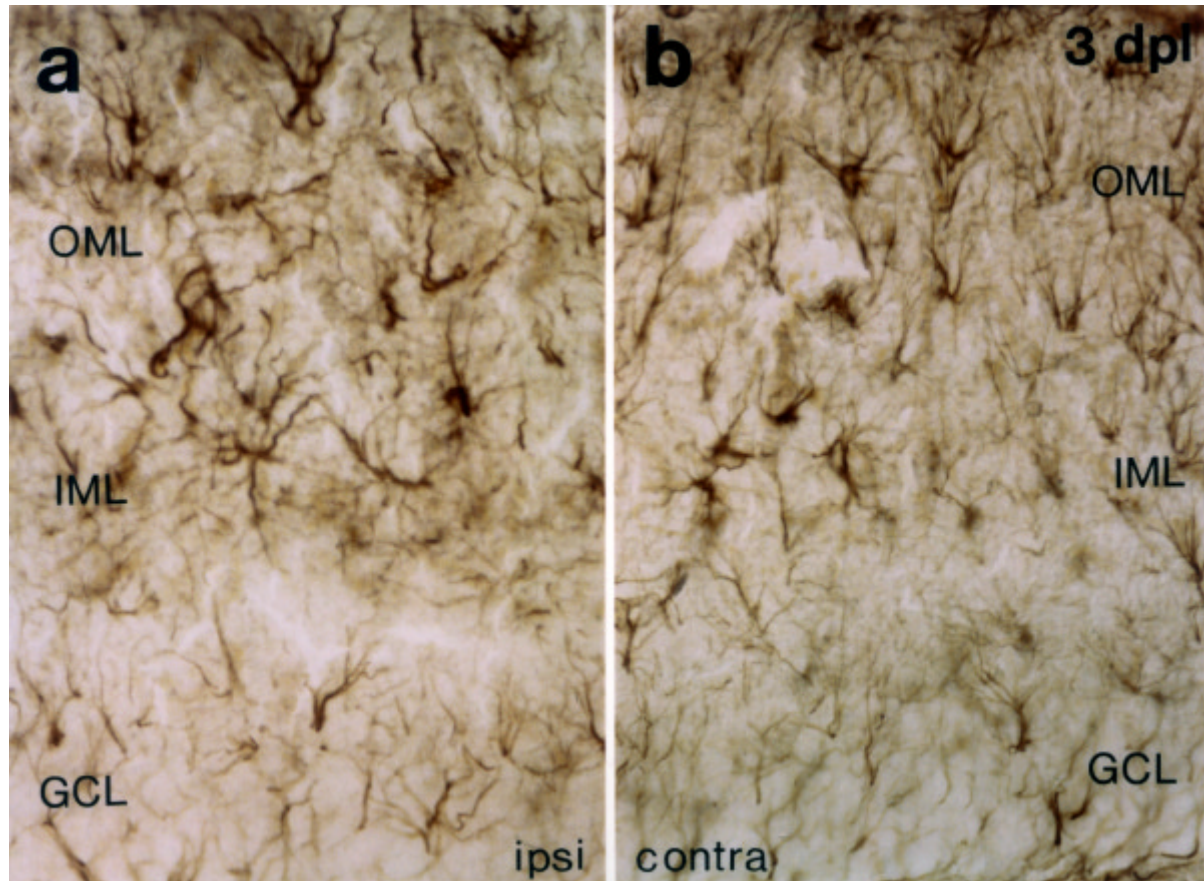


Abb. 15: Astrozyten 3 dpl, ipsilateral-kontralateral. Braun gefärbte Astrozyten mit schlanken Fortsätzen in beiden Hirnhemisphären. Vergrößerung: x 40.

c) Tag 7 nach Läsion (Versuchstiergruppe 3)

Sieben Tage nach Läsion war die ipsilaterale äußere Molekularschicht deutlich von der inneren Molekularschicht abzugrenzen. In der äußeren Molekularschicht befanden sich leicht verdickt erscheinende Astrozyten, von denen auch einige BrdU inkorporiert hatten, und somit ihr Zellkern in der Immunhistochemie blauschwarz angefärbt wurde (s. 3.9.2, Abb. 8).

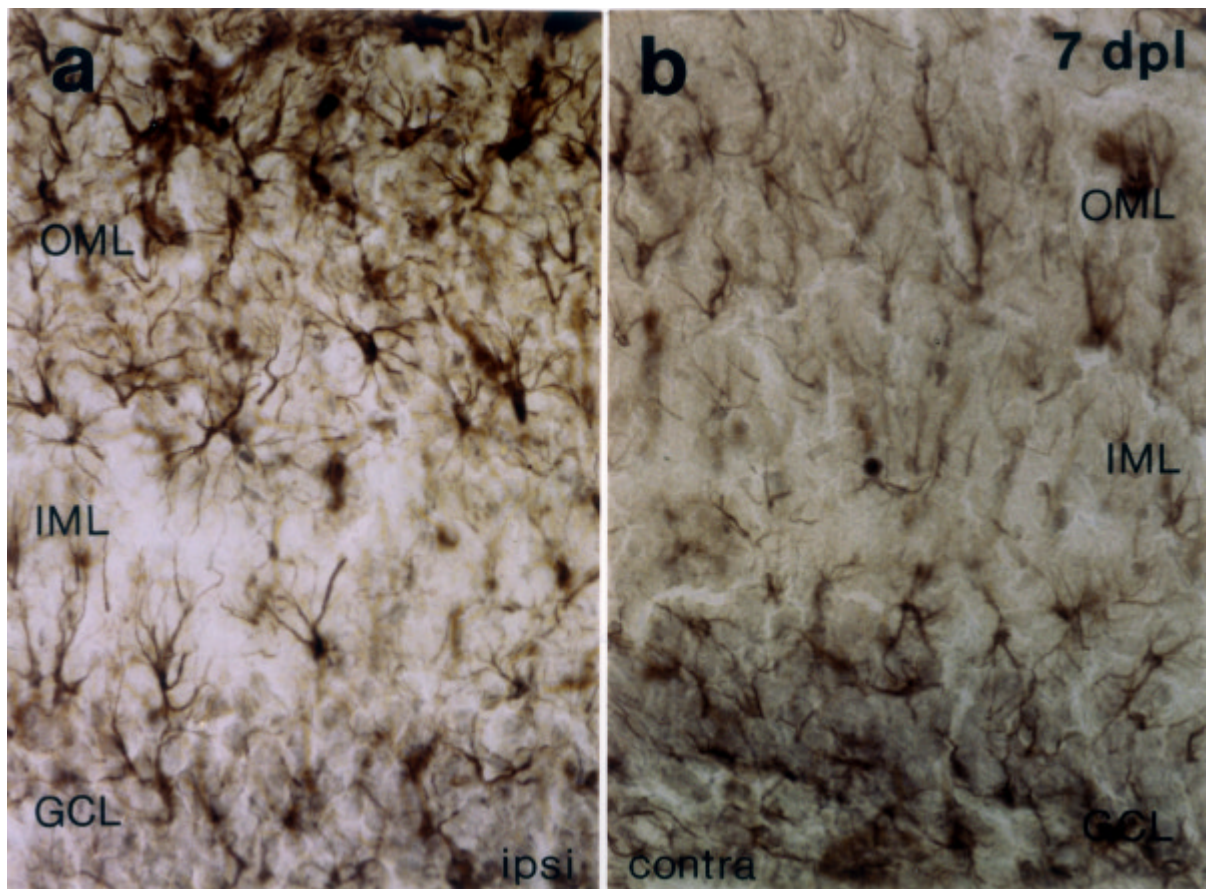


Abb. 16: Astrozyten 7 dpl, ipsilateral-kontralateral. Ipsilateral stärker angefärbte, verdickt erscheinende Astrozyten mit teilweise BrdU-Inkorporation, besonders in der äußeren Molekularschicht. Vergrößerung: x 40.

d) Tag 10 nach Läsion (Versuchstiergruppe 4)

Nach zehn Tagen war ipsilateral zur Läsion ebenfalls ein innerer und äußerer Abschnitt der Molekularschicht abgrenzbar. Dort war eine etwas größere Anzahl Astrozyten als in den bisherigen Stadien zu beobachten. Die Zellen waren sehr stark gefärbt und erschienen verdickt. Einige Astrozyten hatten blauschwarze Zellkerne, d.h. sie haben BrdU-positiv reagiert.

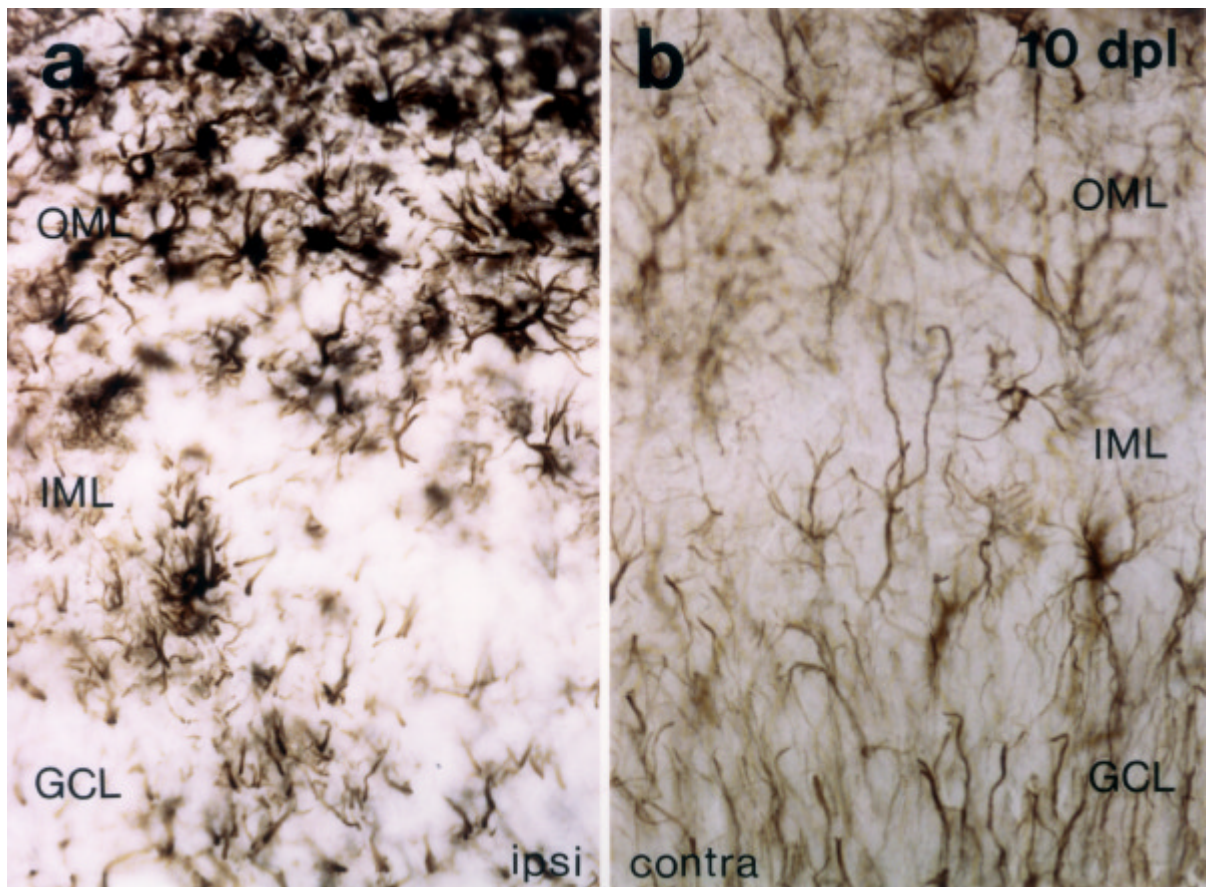


Abb. 17: Astrozyten 10 dpl, ipsilateral-kontralateral. Stark angefärbte, verdickte Astrozyten mit BrdU-positiven Zellkernen besonders in der ipsilateralen äußeren Molekularschicht. Vergrößerung: x 40.

e) Tag 30 nach Läsion (Versuchstiergruppe 5)

Am dreißigsten Tag nach Läsion war die ipsilaterale äußere Molekularschicht wie auch in den vorigen postläsionalen Stadien dunkler als die innere Molekularschicht durchfärbt. In der äußeren Molekularschicht befanden sich zahlreiche mehr oder weniger stark angefärbte Astrozyten mit erkennbar verdickten Fortsätzen. Vereinzelte Astrozyten waren BrdU-positiv.

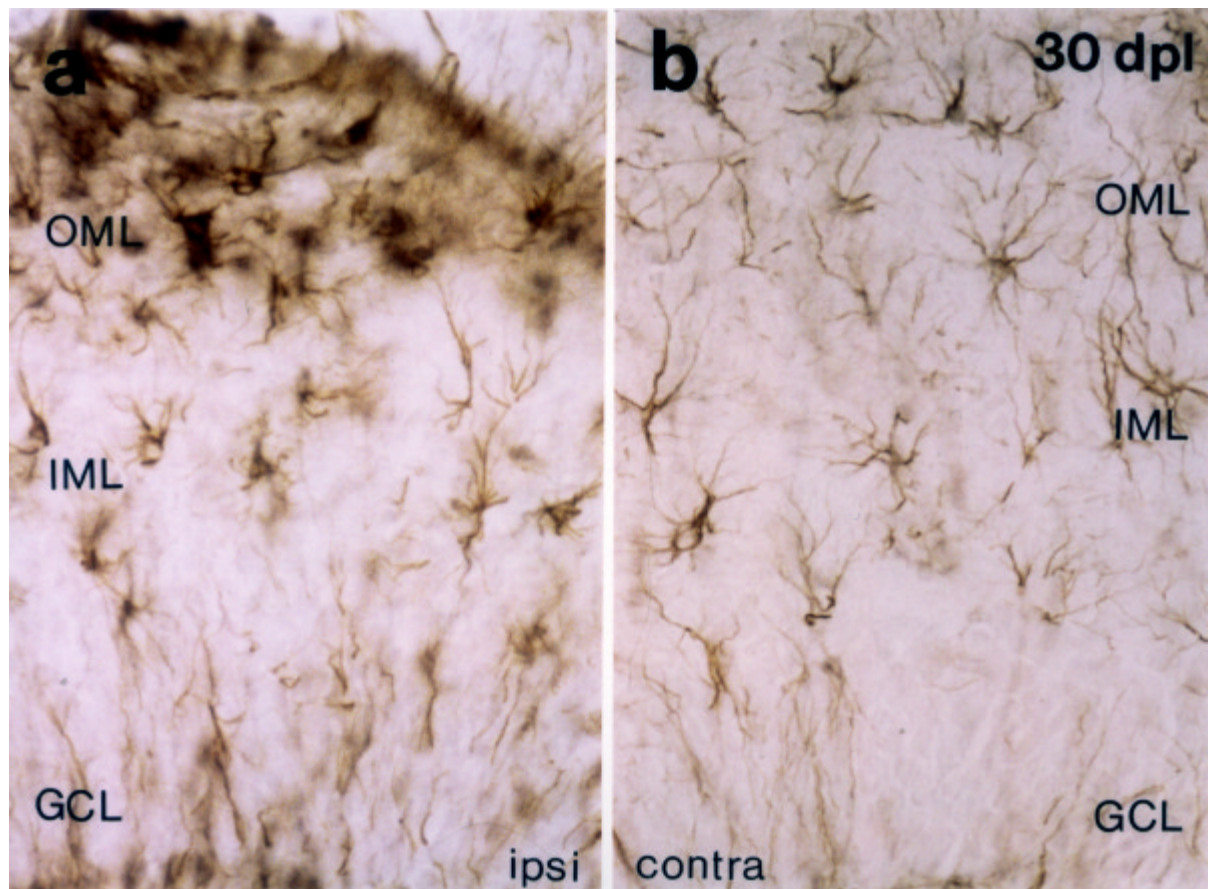


Abb. 18: Astrozyten 30 dpl, ipsilateral-kontralateral. Ipsilateral stark gefärbte neben schwächer angefärbten Astrozyten. Vergrößerung: x 40.

f) Tag 100 nach Läsion (Versuchstiergruppe 6)

Nach einer Zeitspanne von 100 Tagen waren die innere und äußere Molekularschicht im ipsilateralen *Gyrus dentatus* immer noch voneinander abgrenzbar. Es waren in beiden Hirnhälften annähernd gleich viele, schwächer gefärbte Astrozyten mit zarten Fortsätzen zu beobachten, die kaum noch blauschwarze Zellkerne aufwiesen.

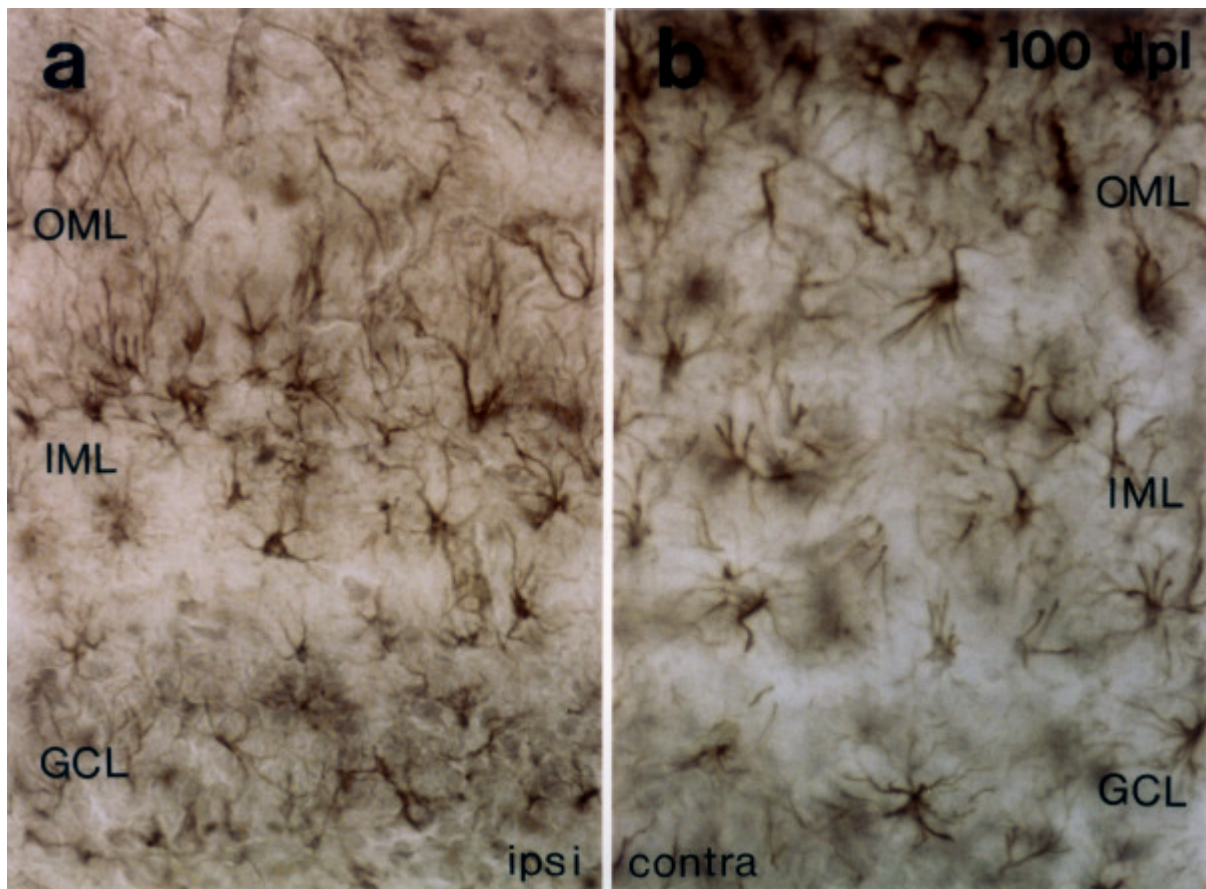


Abb. 19: Astrozyten 100 dpl, ipsilateral-kontralateral. Auf beiden Seiten Astrozyten mit zarten Fortsätzen. Vergrößerung: x 40.

4.2.2 Zellzählung und proliferationskinetische Auswertung bei den Astrozyten

a) Astrozytenzahlen nach entorhinaler Läsion

Drei Tage nach Läsion wurden in der ipsilateralen ML 42,4 Astrozyten pro Gesichtsfeld gezählt (s. Abb. 20a), kontralateral 34,2/Gf. Kontralateral zeigte sich dabei sogar eine signifikante Verringerung an Astrozyten ($p < 0,005$) im Vergleich mit den Kontrollwerten der unlädierten Tiere (rechts 41,3/Gf). Bei den Kontrollen ergab sich auf der linken Seite ein Wert von 41,1/Gf. Bei der GCL waren die Werte ipsi- (8,2/Gf) und kontralateral (8,5/Gf) den Kontrollen gegenüber (links 13,1/Gf, rechts 13,2/Gf) signifikant niedrig ($p < 0,005$).

Sieben Tage nach Läsion wurden ipsilateral 32,1 und kontralateral 20,9 Astrozyten/Gf in der ML gefunden. Das bedeutet für beide Seiten eine signifikante Verminderung ($p < 0,005$), ebenso wie in der GCL. Dort fanden sich ipsilateral 6,7/Gf und kontralateral 7,9/Gf Astrozyten.

Zehn Tage nach Läsion wies die ipsilaterale ML 54,4 Astrozyten/Gf auf, in der kontralateralen ML waren 39,0 Astrozyten/Gf zu zählen. Ipsilateral handelte es sich hierbei um eine signifikante Erhöhung ($p < 0,005$). In der GCL hatten sich Werte von ipsilateral 15,3/Gf und kontralateral 14,5/Gf ergeben, die den Kontrollen gegenüber nicht signifikant verändert waren.

Die Zahl der Astrozyten erreichte in der ML 30 Tage nach Läsion ein Maximum, ipsilateral eine signifikante Erhöhung auf 59,1/Gf ($p < 0,005$), kontralateral waren es 40,8/Gf, den Kontrollen gegenüber also nicht signifikant verändert. Die Werte in der GCL betrugen ipsilateral 11,8/Gf und kontralateral 13,0/Gf, was etwa Kontrollwerten entspricht.

100 Tage nach Läsion war die Astrozytenzahl in der ML wieder auf Kontrollwerte zurückgegangen, ipsilateral 36,7/Gf und 44,8/Gf auf der kontralateralen Seite. In der GCL zeigten sich ipsilateral 12,6/Gf und kontralateral 14,5/Gf.

b) Zahlen proliferierender Astrozyten nach entorhinaler Läsion

Bei den Kontrolltieren waren kaum proliferierende Astrozyten auszumachen: In der linken ML 0,2/Gf, in der GCL 0,0/Gf; in der rechten ML 0,2/Gf und in der GCL 0,1/Gf.

Drei Tage nach Läsion waren die doppelgefärbten, GFAP-BrdU-positiven Astrozyten bereits signifikant vermehrt (s. Abb. 20b): Ipsilateral in der ML 2,9/Gf und in der GCL 0,3/Gf, kontralateral in der ML 1,7/Gf und in der GCL 0,3/Gf (ML: $p < 0,005$; GCL: $p < 0,05$).

Die Anzahl der doppelgefärbten Astrozyten war sieben Tage nach Läsion in der ipsilateralen ML auf 6,3/Gf, kontralateral auf 2,9/Gf signifikant angestiegen ($p < 0,005$). In der GCL waren die Werte ebenfalls signifikant erhöht, auf ipsilateral 0,9/Gf und kontralateral 1,0/Gf ($p < 0,005$).

Zehn Tage nach Läsion wurden in der ipsilateralen ML 3,1 BrdU-positive Astrozyten/Gf gezählt, in der kontralateralen ML 0,7/Gf, was beides noch einer signifikanten Erhöhung entsprach ($p < 0,005$ bzw. $p < 0,05$, s. Abb. 20b). Bei der GCL war nur der ipsilaterale Wert signifikant erhöht (0,4/Gf, $p < 0,05$), kontralateral ergab sich 0,3/Gf.

Die Daten der doppelgefärbten Astrozyten waren 30 Tage nach Läsion ipsilateral noch signifikant erhöht mit 1/Gf in der ML ($p < 0,005$), kontralateral betrugen sie in der ML 0,2/Gf. In der GCL gab es ipsilateral 0,1/Gf, kontralateral 0,1/Gf proliferierende Astrozyten.

100 Tage nach Läsion waren alle Werte in etwa auf Kontrollenniveau: Ipsilaterale ML 0,3/Gf und GCL 0/Gf; kontralaterale ML 0,2/Gf und GCL 0,1/Gf.

c) Der Labeling Index als Marker der Proliferationsquote von Astrozyten

Der Labeling Index der Astrozyten

$$LI = n(\text{GFAP}^+\text{BrdU}^+) / n(\text{GFAP}^+)$$

war drei Tage nach Läsion in der ipsilateralen OML noch relativ niedrig mit 7,3%; 5,0% in der ipsilateralen IML (gesamte ML: 6,7%) und 4,9% in der kontralateralen ML (s. Abb. 20c). Die GCL zeigte einen LI von 3,8% ipsi- und von 3,7% kontralateral.

Sieben Tage nach Läsion war der LI maximal. Bei der ipsilateralen OML war der Wert auf 19,8% angestiegen, in der ipsilateralen IML auf 16,7% (Gesamt-ML: 19,4%). Die kontralaterale ML hatte einen LI von 13,9%. Die LI-Werte der GCL waren ebenfalls angestiegen, auf 13,8% (ipsilateral) bzw. 12,4 (kontralateral).

Zehn Tage nach Läsion konnte man schon einen Rückgang beobachten: der LI der ipsilateralen ML ging auf 5,7% zurück (ipsilaterale OML: LI=7,4%), kontralateral auf 1,8%. Die ipsilaterale IML hatte einen LI von 2,8%. Die Werte für die GCL beliefen sich auf ipsilateral 2,6% und kontralateral 1,8%.

30 Tage nach Läsion erreichte der LI der ipsilateralen OML einen Wert von 2,5%, einen Wert von 1,7% in der ipsilateralen und 0,4% in der kontralateralen ML. Hingegen ergaben sich für die GCL Labeling indices von 0,8% ipsi- und 0,8% kontralateral.

100 Tage nach Läsion unterschieden sich die LI-Werte kaum noch von den Ergebnissen der scheinoperierten Kontrolltiere (links ML 0,5%, GCL 0,1% und rechts ML 0,6%, GCL 0,4%). Im Langzeitstadium waren nur 0,8% (ML ipsilateral), 0,4% (ML kontralateral), 0% (GCL ipsilateral) und 0,5% (GCL kontralateral) der Zellen BrdU-positiv.

d) Vergleich der Astrozytenproliferationsaktivität ipsi- und kontralateral zur entorhinalen Läsion

Drei Tage nach Läsion ergab der Quotient aus den ipsilateralen und kontralateralen Werten doppelgefärbter, d.h. BrdU-positiver Astrozyten in der ML 1,7, der der GCL 1. Somit war z.B. die Anzahl proliferierender Zellen in der ipsilateralen ML 1,7-fach höher als auf der kontralateralen Seite.

Sieben Tage nach Läsion wurde analog eine 2,1-fache Erhöhung der Anzahl proliferierender Zellen in der ipsilateralen ML verglichen mit kontralateral errechnet. In der GCL ergab sich dagegen ein Wert von 0,9. Das bedeutet, daß ipsilateral, verglichen mit kontralateral, weniger proliferierende Zellen zu finden waren.

Zehn Tage nach Läsion ergab sich für die ML ein Wert von 4,4, für die GCL 1,5. Für 30 Tage nach Läsion ergaben sich Werte von 6,0 (ML) und 1 (GCL). 100 Tage nach Läsion für die ML 1,8, und für die GCL ein Wert von 0. Bei den Kontrolltieren ließ sich ein Quotient aus den erhaltenen Werten links geteilt durch rechts von 0,9 (ML) bzw. 0,3 (GCL) errechnen.

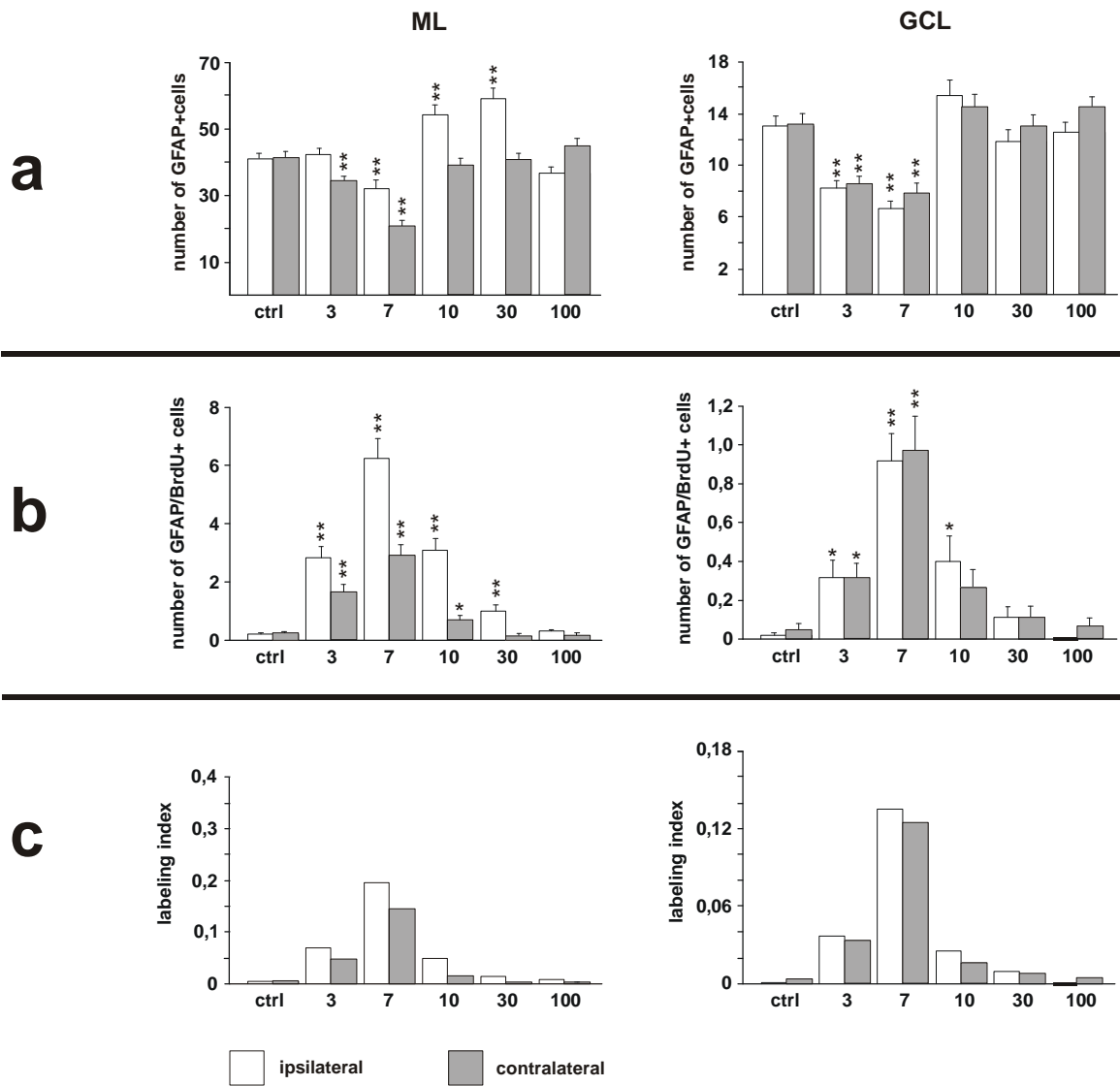


Abb. 20: Statistische Auswertung der Zellzahlen und Proliferationsraten von Astrozyten in den Molekularschichten (ML) und Körnerzellschichten (GCL) beider Hirnhemisphären. **a:** Astrozytenzellzahlen. **b:** Anzahlen BrdU-positiver, also doppelgefärbter Astrozyten. **c:** Labeling indices, ermittelt durch die Anzahlen BrdU-positiver Astrozyten dividiert durch die Gesamtzellzahlen von Astrozyten. Sternchen auf den Säulen repräsentieren die Signifikanz der Daten, im Vergleich mit den Kontrollwerten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.3.1 Mikroglia

- A)** Morphologisch zeigten sich bei den Mikrogliazellen besonders in der ipsilateralen ML typische Zeichen einer Aktivierung: verdickte, gerundete Zellen mit dicken, kurzen Fortsätzen. Diese Veränderungen waren bereits 3 Tage nach Läsion (dpl) maximal ausgeprägt und nahmen bis 30 dpl nur langsam und nicht vollständig ab.
- B)** Die Mikrogliazellzahl (s. Abb. 13a) war im ipsilateralen *Gyrus dentatus* 3 dpl am höchsten, ging zurück und war 30 dpl immer noch signifikant erhöht. Auch kontralateral wurden signifikante Zellzahlerhöhungen beobachtet.
- C)** Eine starke Proliferation von Mikrogliazellen wurde 3 dpl in der ML beobachtet, ließ dann aber rasch nach (s. Abb. 13b).
- D)** Der ermittelte Labeling Index war bei der Mikroglia 3 dpl im gesamten ipsilateralen *Gyrus dentatus* am höchsten (s. Abb. 13c).
- E)** Die Quote proliferierender Mikrogliazellen ipsi- geteilt durch kontralateral war 3 dpl maximal und ging dann leicht zurück. Das bedeutet, daß sich das Zahlenverhältnis proliferierender Zellen von ipsi- zu kontralateral nach entorhinaler Läsion zugunsten von ipsilateral verschiebt.

4.3.2 Astrozyten

- A)** Die Morphologie der Astrozyten veränderte sich ab 7 dpl. Die Zellen erschienen zunehmend verdickt und wurden ab 10 dpl zahlreicher. 100 dpl bot sich, abgesehen von der Abgrenzbarkeit der OML von der IML, ein Bild ähnlich den Kontrollen: Die Zellen zeigten dünne Fortsätze und waren nicht mehr so stark angefärbt.
- B)** Die Astrozytenzellzahl (s. Abb. 20a) ging 3 bis 7 dpl in der ML und GCL beider Seiten signifikant zurück. 10 dpl folgte ein signifikanter Anstieg in der ipsilateralen ML, der 30 dpl maximal war und bis 100 dpl auf Kontrollwerte zurückging.
- C)** Die Proliferationsaktivität der Astrozyten (s. Abb. 20b) war 3 dpl bereits signifikant erhöht und hatte ihren Höhepunkt 7 dpl. 30 dpl gab es nur noch in der ipsilateralen ML eine signifikante Erhöhung, woraufhin die Proliferationsaktivität 100 dpl wieder auf Kontrollwerte zurückging.
- D)** Der Labeling Index (s. Abb. 20c) erreichte bei den Astrozyten 7 dpl seine Höchstwerte, in den Stadien 3 und 10 dpl war er gegenüber den Kontrollen ebenfalls erhöht.
- E)** Das Zahlenverhältnis proliferierender Astrozyten ipsi- zu kontralateral war 30 dpl maximal, doch wurden nicht so hohe Werte wie bei den Mikrogliazellen erreicht.

5. DISKUSSION

5.1 Fragestellung und Ziel

Zu Beginn der Arbeit stellte sich die interessante Frage, ob und wann Gliazellen im Hippokampus als Reaktion auf eine Deafferenzierung proliferieren. Mittels BrdU-Methode und Doppelimmunhistochemie ließen sich proliferierende Zellen spezifisch und in Einzelzellzuordnung als Mikrogliazellen beziehungsweise Astrozyten identifizieren. Dabei zeigte sich, daß die Mikroglia aktiviert wird und drei Tage nach ECL proliferiert. Zehn Tage nach Läsion war ihre Proliferationsaktivität bereits wieder auf Kontrollwerte zurückgegangen. Die stark erhöhte Mikrogliazellzahl in der deafferenzierten Region blieb über längere Zeit bestehen und nahm bis 30 Tage nach Läsion nur langsam ab. Die beobachtete Astrozytenproliferation erreichte sieben Tage nach Läsion ihre höchsten Werte.

Im Modell der ECL wurde bereits von anderen Autoren Mikroglia proliferation im Hippokampus mit einem Maximum zwei bis drei Tage nach Läsion beschrieben [14; 10]. Die in den Experimenten gewählten Zeiträume umfaßten bei Gall *et al.* (1979) 20, 30, 50 und 80 Stunden nach Läsion, bei Fagan und Gage (1994) 24 und 72 Stunden. Eine später als vier Tage nach Läsion stattfindende Gliazellproliferation, etwa die von Astrozyten, hätte man in diesen Studien nicht entdecken können, da dort nur die ersten vier Tage nach ECL untersucht wurden. Meist fand dabei die nachteiligere Methode der [³H]-Thymidin-Autoradiographie zur Erfassung proliferierender Zellen Verwendung. Autoren anderer Studien haben in dieser Fragestellung gar keinen Proliferationsmarker benutzt [26]. Lynch *et al.* (1975) haben die Vermutung einer Proliferation nur anhand von Zellzählungen belegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb eine exakte Quantifizierung der Zellzahlen und Proliferationsraten von Mikrogliazellen und Astrozyten in der Molekularschicht (ML) sowie der Körnerzellschicht (GCL) des hippokampalen *Gyrus dentatus* beider Hirnhemisphären mit Hilfe der etablierten BrdU-Methode, über einen Zeitraum von bis zu 100 Tagen nach einseitiger ECL.

5.2 Interpretation der eigenen Ergebnisse

5.2.1 Rolle von Proliferation und Migration

Die regionsspezifische Zunahme von Gliazellzahlen kann Folge der beobachteten Proliferationsaktivität sein. Zusätzlich ist zelluläre Migration eine mögliche Ursache für Zellzahlerhöhungen. Die sehr rasche proliferative Reaktion der Mikroglia drei Tage nach Läsion paßt zu dem ebenfalls frühen Zeitpunkt der Mikrogliaaktivierung nach ECL. Analog dazu korreliert die Astrozytenproliferation im *Gyrus dentatus* nach ECL zeitlich mit der beschriebenen, im Vergleich zur Mikroglia später einsetzenden Astrogliaaktivierung. Der initiale Abfall der Astrozytenzahlen drei und sieben Tage nach Läsion und die Zunahme der Astrozytenproliferation in der GCL ohne wesentlichen begleitenden Zellzahlanstieg könnte dafür sprechen, daß in der GCL proliferierende Astrozyten in hiläre Regionen und in die benachbarte ML migrieren, wo sie zum signifikanten Zellzahlanstieg beitragen. Bei der Zunahme der Gliazellzahlen im deafferenzierten Areal spielt nach der Vermutung einiger Autoren Proliferation eine Rolle [14; 9; 10; 13]. Manche Autoren glauben jedoch, daß Astrozyten bei Läsionsgeschehen eher aus anderen Hirnregionen einwandern, als daß sie selbst proliferieren [8]. Migration von Mikrogliazellen und Astrozyten auf den Reiz der Deafferenzierung hin kann wie auch ortsständige Proliferation zur Zunahme der Zellzahl beitragen [9; 10; 26].

5.2.2 Astrozyten-Zellzahlenanstieg und GFAP-Reaktivität

Die Beobachtung, daß Astrozyten während ihrer Aktivierung stärker GFAP-reaktiv werden als im ruhenden Zustand [41], könnte eine relative Zellzahlerhöhung vortäuschen. Schwach GFAP-reaktive Astrozyten im Ruhestadium könnten bei der Zählung leicht übersehen werden, was zu falsch-niedrigen Werten in Ruhestadium führen kann. Allerdings ist die GFAP-Expression bei proliferierender Astroglia verstärkt [28]. Neben dieser unechten Zellzahlerhöhung kann es durch die nachgewiesene Proliferation und durch Migration zu einer tatsächlichen Astrozytenzunahme kommen.

5.2.3 Abnahme der Astrozytenzahlen in den frühen Stadien

In den Stadien drei und sieben Tage nach Läsion war eine Abnahme der Astrozytenzellzahlen sowohl in der ML (abgesehen von ipsilateral 3 dpl) als auch in der GCL auf beiden Seiten zu verzeichnen. Eine derartige Beobachtung wurde bisher nicht beschrieben, obwohl z.B. quantitative Untersuchungen über GFAP mRNA in der Zeit nach ECL existieren [56]. Ein Grund für diesen frühen Zellzahlenabfall kann eine Migration von Astrozyten aus der GCL in andere Areale sein. Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß eine Subpopulation von Astrozyten kurz vor der proliferationsaktiven Phase, welche sich nach den vorliegenden Ergebnissen etwa 10-30 Tage nach Läsion hinzieht, nur schwach reaktiv für GFAP ist. Eine signifikante Proliferationsaktivität wurde aber nur in der ipsilateralen ML beobachtet.

5.2.4 Beteiligung humoraler Faktoren an der Gliareaktion

Die Mechanismen, die an der Proliferationsreaktion beteiligt sind, sind noch nicht vollständig bekannt. Man diskutiert Triggersubstanzen, die von degenerierenden Axonen und Terminalen freigesetzt werden und das Verhalten der Mikroglia beeinflussen [14]. Eine Proliferation dieser Zellen könnte von humoralen Faktoren oder metabolischen Substanzen in Gebieten mit Terminalendegeneration hervorgerufen werden.

Proliferierende, aktivierte Mikroglia könnte in der Lage sein, neuronalen Zellabfall zu phagozytieren [9; 3]. Es gibt die Hypothese, daß infolge entorhinaler Läsion die phagozytierende, aktivierte Mikroglia zur Sekretion von Interleukin-1 (IL-1) in der Lage ist, dessen Konzentration im deafferenzierten Hippokampus einen bis drei Tage nach Läsion ein Maximum erreicht [9]. Das würde gut zu der Beobachtung passen, daß zum Zeitpunkt von drei Tagen nach ECL die Proliferation von Mikrogliazellen maximal ist.

IL-1 ist ein astrozytenstimulierender Faktor und wird als einer der Effektoren für die nach ECL beobachtete Astrozytenaktivierung, also Hypertrophie und Anstieg der

Zellzahl von etwa Tag fünf nach Läsion an, diskutiert [9]. Außerdem induziert IL-1 Astrogliaproliferation *in vitro* und *in vivo* [18; 9] und könnte also für die beobachtete Proliferation von Astrozyten mit verantwortlich sein. In dieser Arbeit wurde eine Proliferationsaktivität von Astrozyten, beginnend drei Tage nach Läsion, mit Maximum sieben Tage nach Läsion und darauffolgendem Anstieg der Astrozytenzahlen, registriert.

Aktivierte Astrozyten sezernieren *in vivo* neurotrophische Faktoren, die das Überleben und das axonale Wachstum von Neuronen unterstützen. Die Aktivität von NGF steigt nach Läsionen des *Tractus perforans* im DG an [13; 16]. Fagan *et al.* (1997) konnten hingegen keine Veränderung bei der NGF-mRNA nach ECL feststellen. Eine Hochregulation von CNTF auf Astrozyten der ipsilateralen OML beobachtete man etwa drei bis vierzehn Tage nach ECL, mit einem Maximum sieben Tage nach Läsion [31]. Auch wurde eine vermehrte Expression von bFGF auf Astrozyten und auf extrazellulärer Matrix sowie ein Anstieg der FGF-2-mRNA bei Astrozyten nach ECL beschrieben [19; 11]. Eine Veränderung beim BDNF konnte man bis zehn Tage nach Läsion nicht feststellen [29].

Besonders für den NGF wird eine wichtige Rolle beim cholinergen Sprouting postuliert. Proliferierende, aktivierte Astrozyten könnten über die Sekretion humoraler Faktoren das Aussprossen und Einwachsen cholinerg und katecholaminerger Nervenfasern bewirken, welche auf NGF ansprechen. Dies könnte den Beginn des cholinergen Sprouting als Antwort auf eine Deafferenzierung erklären [9; 13; 16].

5.2.5 Unerwartet starke Reaktionen in der Körnerzellschicht

Die signifikanten Zellzahlanstiege 3-30 Tage nach Läsion und die signifikante Proliferationsaktivität ipsilateral drei Tage nach Läsion bei der Mikroglia in der Körnerzellschicht waren eine unerwartete Beobachtung. Eine signifikante Gliaaktivierung in nicht direkt deafferenzierten Regionen wurde bisher noch nicht beschrieben. Bei Körnerzellen führt eine Deafferenzierung zu beträchtlichen transneuronalen Veränderungen in ihrer Dendritenstruktur [7] und in ihren Efferenzen über das Moosfasersystem [38]. Transneuronale Veränderungen im Moosfasersystem könnten ein adäquater Stimulus für Gliazellaktivierung sein, welche schließlich eine proliferative Reaktion und Zellzahlerhöhung in einer nicht direkt denervierten Region induzieren könnte. Bei den Astrozyten kommt es in der GCL zu einer signifikant gesteigerten Proliferation ohne darauffolgende Zellzahlerhöhung. Das könnte bedeuten, daß Astrozyten aus der GCL in andere Regionen, etwa in den Hilus oder die ML, auswandern.

5.2.6 Kontralaterale Aktivierung

Kontralateral zur ECL wurde bei den Mikrogliazellen eine Zellzahlerhöhung und bei den Astrozyten eine verstärkte Proliferationsaktivität festgestellt. Diese kontralaterale Aktivierung, die insgesamt meist geringer ausgeprägt war als ipsilateral, rührt wahrscheinlich von einer Läsion des gekreuzten *Tractus perforans* her (s. 1.1.2, bzw. [1]). Der über eine Kommissur gekreuzt verlaufende Anteil des *Tractus perforans* enthält weniger Fasern als der ipsilateral verlaufende Hauptanteil. Somit war im kontralateralen DG eine Gliaaktivierung von geringerem Ausprägungsgrad als ipsilateral zu erwarten.

5.3 Beurteilung der BrdU-Methode für proliferationskinetische Untersuchungen

Die BrdU-Methode bietet mehrere Vorteile gegenüber der Methode der [^3H]-Thymidin-Autoradiographie (s. 2.1). Das sind die geringeren Kosten, der geringere Zeitaufwand und die Vermeidung von Radioaktivität bei den Experimenten [54; 53]. Vor allem aber auch die weitaus einfachere Handhabung und dazu die Möglichkeit einer spezifischen, systematischen Einzelzellzuordnung bei der Auswertung der Ergebnisse.

Bei Negativkontrollen (s. 3.8.3 d) erwies sich die Spezifität der BrdU-Methode als sehr hoch. Unter Verzicht auf den Primärantikörpercocktail gegen BrdU war hier keinerlei unspezifische Farbreaktion nachweisbar. Die Anwendung der nach Hsu *et al.* (1981) modifizierten ABC-Methode bei der BrdU-Immunhistochemie macht diese zu einem gut durchführ- und reproduzierbaren quantitativen Nachweisverfahren für proliferierende Zellen im histologischen Hirnschnitt.

5.4 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde die Proliferation von Mikrogliazellen und Astrozyten im deafferenzierten *Gyrus dentatus* der Ratte nach Läsion des entorhinalen Kortex quantitativ untersucht und dokumentiert. Die Mikrogliaproliferation mit Maximum drei Tage nach Läsion und die Astrozytenproliferation mit ihrem Maximum sieben Tage nach Läsion können zum Verständnis der Vorgänge und Mechanismen bei anterograder Degeneration beitragen. Das führt zu der Frage, was die Bedeutung der Gliazellaktivierung und -proliferation in diesem Modell sein könnte.

Es gibt kontroverse Meinungen, ob durch eine Gliaaktivierung induzierte Veränderungen sich generell zuträglich oder nachteilig für eine Gewebsregeneration auswirken [8; 10; 17; 20; 41; 55]. Die Glianarbe (engl. "glial scar") könnte durch Stabilisierung des Gewebes und durch Abgrenzen von nekrotischen Arealen zur Wundheilung beitragen [8; 12] und als Leitschiene für das axonale Wachstum dienen. Astrozyten sind in der Lage zur Sekretion von Proteasen, um Zellabfall zu

verdauen. Sie produzieren antioxidative Enzyme, die z.B. hohe Glutamatspiegel weniger schädlich machen können. So können Astrozyten sich selbst und ihre Umgebung schützen. Sie sezernieren außerdem neurotrophische Faktoren (wie NGF und bFGF, s.o.), die das reaktive Sprouting beeinflussen und regulieren können [8; 40].

Andererseits kann eine Glianarbe eine Barriere darstellen, die das Auswachsen von Neuriten behindert [8; 17; 37]. Die astrozytären Proteasen können regenerierendes Gewebe beeinträchtigen [8]. Und Astrozyten exprimieren Moleküle, die für die axonalen Regenerationsprozesse abträglich sind [50]. Mikrogliazellen setzen neuronotoxische Faktoren frei, welche die Gliazellen selbst nicht beeinträchtigen [17].

Es wäre interessant zu sehen, welche Auswirkungen eine Suppression von Gliaproliferation auf den Regenerationsprozeß hätte. Die Anwendung von antiproliferativem Cytosin-Arabinosid (Ara-C) verhinderte die Proliferation von Gliazellen in der deafferenzierten ML, hatte jedoch keinerlei Effekte auf das cholinerge Sprouting [10]. Das wirft die Frage auf, ob Gliaproliferation für das cholinerge Sprouting notwendig ist, und welche Vorgänge genau durch Gliaproliferation nach ECL beeinflußt werden. Insgesamt kann man sagen, daß Gliazellproliferation als Folge von Deafferenzierung ein Faktor sein kann, der das Ausmaß und die Qualität von neuronalen Reparaturmechanismen mitbestimmt, ob jetzt im Sinne einer für die Reparaturvorgänge zuträglichen oder hinderlichen Beeinflussung [10].

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die präzise Quantifizierung der Zellzahlen und Proliferationsraten von Mikrogliazellen und Astrozyten in der Molekularschicht (ML) sowie der Körnerzellschicht (GCL) des Hippokampus zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einseitiger entorhinaler Läsion (ECL). Die Überlebensstadien beliefen sich bei den Mikrogliauntersuchungen auf 3, 10 und 30 Tage nach Läsion (dpl), bei den Astrozytenexperimenten auf 3, 7, 10, 30 und 100 dpl.

Pro Überlebensstadium wurden vier männliche, ausgewachsene Wistar-Albinoratten verwendet. Eine Stunde vor ihrer Tötung erhielten die Tiere Injektionen von 100 mg/kg KG 5'-Bromo-2'-deoxyuridin, was als Thymidinanalogon während der S-Phase des Zellzyklus von proliferierenden Zellen kompetitiv in die DNS eingebaut wird. BrdU kann man mit Hilfe monoklonaler Antikörper immunhistochemisch an Hirnschnitten darstellen, nachdem das Gewebe zuvor proteolytisch behandelt und denaturiert wurde. Die histochemischen Doppelfärbungen auf BrdU und GFAP, ein astrozytenspezifisches Antigen, bzw. BrdU und Mikrogliazellen, markiert durch *Griffonia simplicifolia* Isolektin B₄, erfolgten gemäß der ABC-Methode nach Hsu *et al.* (1981). So konnte man die Gesamtzellzahl und die Anzahl proliferierender Zellen beider Zellarten spezifisch auf Einzelzellniveau unter dem Lichtmikroskop erfassen. Der Hippokampus wurde bei 40-facher Vergrößerung jeweils in sechs Gesichtsfelder unterteilt, was bei fünf verwendeten Hirnschnitten pro Stadium jeweils 30 Gesichtsfelder im linken und 30 Gesichtsfelder im rechten Hippokampus ergab. In den einzelnen Gesichtsfeldern erfolgte die Auswertung für die OML, IML und GCL des *Gyrus dentatus* (ipsilateral zur ECL) beziehungsweise für die gesamte ML und die GCL (kontralateral und bei den Kontrollen) getrennt: Es wurden die Gesamtzahl Mikrogliazellen bzw. Astrozyten und die Anzahl BrdU-positiver Zellen beider Arten sowie der Labeling Index (LI), der Quotient aus BrdU-positiven Zellen und der Gesamtzellzahl einer Zellart, bestimmt.

Die Mikrogliazellzahl war in der ipsilateral zur Läsion gelegenen ML des *Gyrus dentatus* (DG) 3 dpl am höchsten (5,9-fach gegenüber der Kontrolle). Sie ging danach zurück und war 30 dpl gegenüber den Kontrollwerten noch immer signifikant um den Faktor 2,8 (DG gesamt: 2,9) erhöht. Auch kontralateral und in der GCL

konnte man signifikante Zellzahlerhöhungen beobachten. Die Anzahl der Astrozyten ging zunächst 3 und 7 dpl signifikant zurück, stieg in der ipsilateralen ML 10 dpl (um den Faktor 1,3) signifikant über die Kontrollwerte an, war 30 dpl gegenüber der Kontrolle signifikant 1,4 (DG 1,3)-fach erhöht und ging 100 dpl auf Kontrollwerte zurück. Vor allem in den äußeren zwei Dritteln der ML des ipsilateralen DG zeigte sich 3 dpl bei der Mikroglia eine maximale, signifikante Proliferationsaktivität, die danach rasch zurückging. Die reaktive Proliferation der Astrozyten in der ML und der GCL war 3 dpl signifikant hoch und erreichte einen Höhepunkt 7 dpl, worauf sie 30-100 dpl wieder auf Kontrollwerte zurückging. Diese Daten zeigen, daß in der frühen postläsionalen Phase von 3 dpl die Mikrogliazellen ihre höchste Proliferationsrate und Zellzahl erreichen. Demgegenüber setzt die Proliferationsaktivität der Astrozyten um 3 dpl ein, steigert sich noch bis 7 dpl und geht erst langsam zurück. Ihre absolute Zahl erreicht ein Maximum 30 dpl.

Die gewonnen Ergebnisse können dazu beitragen, die neuronalen, glialen und humoralen Prozesse, die in der deafferenzierten ML des Hippokampus stattfinden, besser zu erklären und zu verstehen. Sie können Informationen über den zeitlichen Ablauf läsionsinduzierter Veränderungen und Wundreparaturmechanismen beisteuern. Welche Rolle die Gliazellproliferation bei den transneuronalen Veränderungen im entorhinal-hippokampalen Läsionsmodell und in Regionen terminaler Degeneration und bei läsionsinduzierten Reparaturmechanismen spielt, bleibt noch genauer zu prüfen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amaral, D.G. and Witter, M.P. Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System*, edited by Paxinos, G. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 443-493, 1995.
2. Aubert, I., Poirier, J., Gauthier, S., and Quirion, R. Multiple cholinergic markers are unexpectedly not altered in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesions. *J. Neurosci.* 14(5 Pt 1):2476-2484, 1994.
3. Bechmann, I. and Nitsch, R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20:145-154, 1997.
4. Cotman, C.W. and Nadler, J.V. Reactive synaptogenesis in the hippocampus. In C.W. Cotman (ed.): *Neuronal Plasticity*. New York: Raven Press, 227-271, 1978.
5. Day, J.R., Laping, N.J., Lampert Etchells, M., Brown, S.A., O'Callaghan, J.P., McNeill, T.H., and Finch, C.E. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience* 55(2):435-443, 1993.
6. Deller, T., Nitsch, R., and Frotscher, M. Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tracing of commissural fibers to the rat dentate gyrus: evidence for a previously unknown commissural projection to the outer molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 352(1):55-68, 1995.
7. Diekmann, S., Ohm, T.G., and Nitsch, R. Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol.* 6: 205-215, 1996.
8. Eddleston, M. and Mucke, L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54(1):15-36, 1993.
9. Fagan, A.M. and Gage, F.H. Cholinergic sprouting in the hippocampus: a proposed role for IL-1. *Exp. Neurol.* 110(1):105-120, 1990.
10. Fagan, A.M. and Gage, F.H. Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Neuroscience* 58(4):705-725, 1994.
11. Fagan, A.M., Suhr, S.T., Lucidi-Phillipi, C.A., Peterson, D.A., Holtzman, D.M., and Gage, F.H. Endogenous FGF-2 is important for cholinergic sprouting in the denervated hippocampus. *J. Neurosci.* 17(7):2499-2511, 1997.
12. Fages, C., Le Prince, G., Didier Bazes, M., Rolland, B., Hardin, H., and Tardy, M. Long-term astroglial reaction to serotonergic fiber degeneration. *Brain Res.* 639(1):161-166, 1994.

13. Gage, F.H., Olejniczak, P., and Armstrong, D.M. Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. *Exp.Neurol.* 102(1):2-13, 1988.
14. Gall, C., Rose, G., and Lynch, G. Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *J.Comp.Neurol.* 183(3):539-549, 1979.
15. Geddes, J.W., Monaghan, D.T., Cotman, C.W., Lott, I.T., Kim, R.C., and Chui, H.C. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 230(4730):1179-1181, 1985.
16. Gehrmann, J., Schoen, S.W., and Kreutzberg, G.W. Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus: A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol.* (442-455), 1991.
17. Giulian, D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia* 7(1):102-110, 1993.
18. Giulian, D. and Lachman, L.B. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228(4698):497-499, 1985.
19. Gomez-Pinilla, F., Lee, J.W., and Cotman, C.W. Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J.Neurosci.* 12(1):345-355, 1992.
20. Goss, J.R. and Morgan, D.G. Enhanced glial fibrillary acidic protein RNA response to fornix transection in aged mice. *J.Neurochem.* 64(3):1351-1360, 1995.
21. Gratzner, H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218(4571):474-475, 1982.
22. Guesdon, J.L., Ternynck, T., and Avrameas, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J.Histochem.Cytochem.* 27(8):1131-1139, 1979.
23. Hailer, N.P., Bechmann, I., Heizmann, S., and Nitsch, R. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus.* 7(3):341-349, 1997.
24. Howard, A., and Pelc, S.R. Nuclear incorporation of ³² P as demonstrated by autoradiographs. *Exp. Cell. Res.* 2: 178, 1951.
25. Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* 29:577-580, 1981.

26. Jensen, M.B., Gonzalez, B., Castellano, B., and Zimmer, J. Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp.Brain Res.* 98(2):245-260, 1994.
27. Kahle, J.S. and Cotman, C.W. Synaptic reorganization in the hippocampus: an electrophysiological analysis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 702:61-74, 1993.
28. Langan, T.J. and Slater, M.C. Quiescent astroglia in long-term primary cultures re-enter the cell cycle and require a non-sterol isoprenoid in late G1. *Brain Res.* 548(1-2):9-17, 1991.
29. Lapchak, P.A., Araujo, D.M., and Hefti, F. BDNF and trkB mRNA expression in the rat hippocampus following entorhinal cortex lesions. *Neuroreport* 4/2:191-194, 1993.
30. Lee, K.S., Stanford, E.J., Cotman, C.W., and Lynch, G.S. Ultrastructural evidence for bouton proliferation in the partially deafferented dentate gyrus of the adult rat. *Exp.Brain Res.* 29(3-4):475-485, 1977.
31. Lee, M.Y., Deller, T., Kirsch, M., Frotscher, M., and Hofmann, H.D. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF Receptor α expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J.Neurosci.* 17(3):1137-1146, 1997.
32. Leonhardt, H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage, 1990.
33. Lynch, G., Matthews, D.A., Mosko, S., Parks, T., and Cotman, C.W. Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain Res.* 42: 311-318, 1972.
34. Lynch, G., Rose, G., Gall, C., and Cotman, C.W. The response of the dentate gyrus to partial deafferentation. In Golgi Centennial Symposium Proceedings (ed. Santini M.), 305-317. Raven Press, New York, 1975.
35. Lynch, G., Stanfield, B., Parks, T., and Cotman, C.W. Evidence for selective postlesion axonal growth in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res.* 69, 1-11, 1974.
36. Matthews, D.A., Cotman, C., and Lynch, G. An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res.* 115(1):1-21, 1976.
37. Nieto-Sampedro, M., Saneto, R.P., de Vellis, J., and Cotman, C.W. The control of glial populations in brain: changes in astrocyte mitogenic and morphogenic factors in response to injury. *Brain Res.* 343(2):320-328, 1985.
38. Nitsch, R. Transneuronal changes in the lesioned entorhinal-hippocampal system. *Hippocampus* 3/Spec. Iss. (247-256), 1993.

39. Nitsch, R. and Frotscher, M. Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin-containing neurons of the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus*. (481-490), 1993.
40. Nixdorf-Bergweiler, B.E., Albrecht, D., and Heinemann, U. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12(3):180-195, 1994.
41. Norenberg, M.D. Astrocyte responses to CNS injury. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 53(3):213-220, 1994.
42. Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego:Academic Press, 1986.
43. Peterson, D.A., Lucidi Phillipi, C.A., Eagle, K.L., and Gage, F.H. Perforant path damage results in progressive neuronal death and somal atrophy in layer II of entorhinal cortex and functional impairment with increasing postdamage age. *J.Neurosci.* 14(11 Pt 2):6872-6885, 1994.
44. Poirier, J., Hess, M., May, P.C., and Finch, C.E. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 11(2):97-106, 1991.
45. Poirier, J., Hess, M., May, P.C., and Finch, C.E. Cloning of hippocampal poly(A) RNA sequences that increase after entorhinal cortex lesion in adult rat. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 9(3):191-195, 1991.
46. Ramón y Cajal, S. Estudios sobre la corteza cerebral humana. IV. Estructura de la corteza cerebral olfativa del hombre y mamíferos. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid 1: 1-140, 1901.
47. Reier, J.P. Gliosis following CNS injury: The anatomy of astrocytic scars and their influences on axonal elongation. In *Astrocytes* (eds Fedoroff S. and Vernadakis A.) 263-324, Academic Press, Orlando, 1986.
48. Rio-Hortega, P. del, and Penfield, W. Cerebral Cicatrix: The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 41: 278-303, 1927.
49. Rose, G., Lynch, G., and Cotman, C.W. Hypertrophy and redistribution of astrocytes in the deafferented dentate gyrus. *Brain Res.Bull.* 1(1):87-92, 1976.
50. Rudge, J.S. and Silver, J. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J.Neurosci.* 10(11):3594-3603, 1990.
51. Schousboe, A., Bachevalier, J., Braak, H., Heinemann, U., Nitsch, R., Schroder, H., and Wetmore, C. Structural correlates and cellular mechanisms in entorhinal-hippocampal dysfunction. *Hippocampus*. 3 Spec No:293-301, 1993.
52. Sloviter, R.S. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann.Neurol.* 35(6):640-654, 1994.

53. Soriano, E. and Del Río, J.A. Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J.Histochem.Cytochem.* 39(3):255-263, 1991.
54. Soriano, E., Del Río, J.A., Martinez Guijarro, F.J., Ferrer, I., and Lopez, C. Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine in fluoro-gold-labeled neurons: a simple technique to combine retrograde axonal tracing and neurogenetic characterization of neurons. *J.Histochem.Cytochem.* 39(11):1565-1570, 1991.
55. Steward, O. Cholinergic sprouting is blocked by repeated induction of electroconvulsive seizures, a manipulation that induces a persistent reactive state in astrocytes. *Exp.Neurol.* 129(1):103-111, 1994.
56. Steward, O. Synapse replacement on cortical neurons following denervation. *Cerebral Cortex* 9: 81-132, 1991.
57. Steward, O, and Vinsant, S.L. The process of reinnervation in the dentate gyrus of the adult rat: a quantitative electron microscopic analysis of terminal proliferation and reactive synaptogenesis. *J. Comp. Neurol.* 214: 370-386, 1983.
58. Steward, O., Cotman, C.W., and Lynch, G. Growth of a new fiber projection in the brain of the adult rat: Reinnervation of the dentate gyrus by the contralateral entorhinal cortex following ipsilateral lesions. *Exp. Bran Res.* 20: 45-66, 1974.
59. Steward, O., Kelley, M.S., and Torre, E.R. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: Temporal relationship between changes in the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp. Neurol.* 124: 167-183, 1993.
60. Steward, O., Torre, E.R., Phillips, L.L., and Trimmer, P.A. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: time course of increases in mRNA for glial fibrillary acidic protein. *J.Neurosci.* 10(7):2373-2384, 1990.
61. Steward, O., Vinsant, S.L., and Davis, L. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: An ultrastructural study of changes in presynaptic terminals as a result of sprouting. *J. Comp. Neurol.* 267: 203-210, 1988.
62. Streit, W.J., and Kreutzberg, G.W. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J. Neurocytol.* 16: 249-260, 1987.
63. Streit, W.J., and Kreutzberg, G.W. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J. Comp.Neurol.* 268: 248-263, 1988.
64. Taylor, J.H., Woods, P.S., and Hughes, W.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43: 122, 1957.

8. ANHANG

Curriculum Vitae

Name: Anne Katharina Grampp
 Geburtsdatum: 1.6.1973
 Geburtsort: Kulmbach
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Gerhard Grampp, Physiker
 Anita Grampp, geb. Reinhardt, Sekretärin

Schulbildung:

9/1979-7/1983 Jean-Paul-Volksschule Bayreuth
 9/1983-7/1992 Gymnasium Christian-Ernestinum Bayreuth
 7/1992 Abitur

Studium:

10/1992-9/1994 Aufnahme des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 10/1994-6/1999 Weiterführung des Medizinstudiums an der Humboldt-Universität Berlin
 9/1994 Ärztliche Vorprüfung
 8/1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 8/1997 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 6/1999 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Amerikanische Staatsexamina:

11/1999 USMLE step 2
 3/2000 USMLE step 1

Außerdem Teilnahme an folgenden universitären Veranstaltungen:

Schwedisch III (Universität Würzburg); Einführung Indogermanistik, Philosophie für Theologen (Humboldt-Universität Berlin); Persisch I, II, III (Freie Universität Berlin)
 Mitarbeit bei der Fachschaft Medizin in Würzburg und Berlin

Pflegepraktika:

3-4/1993 Abteilung für Viszeralchirurgie am Klinikum Bayreuth
 8/1993 Gynäkologische Abteilung am 1. Städtischen Krankenhaus Moskau

Famulaturen:

3/1995	Praxis für Allgemeinmedizin und Schmerztherapie in Bayreuth
2/1996	Zentrum der Rechtsmedizin an der Universität Frankfurt/Main (Prof. Dr. Bratzke)
7-8/1996	Chirurgische Poliklinik an der Universitätsklinik Frankfurt/Main
8-9/1996	Abteilung für pädiatrische Neurologie am Albert Einstein College of Medicine in New York (Prof. Dr. Moshé)
2-3/1997	Zentrum der Dermatologie und Venerologie an der Universitätsklinik Frankfurt/Main (Prof. Dr. Kaufmann)

Praktisches Jahr:

4-8/1998	Innere Abteilung am St. Hedwig-Krankenhaus Berlin (CA Dr. sc. med. Palowski)
8-9/1998	Neurologische Klinik der Charité Berlin (Prof. Dr. Einhüpl, Prof. Dr. Harms)
9-12/1998	Abteilung für Neurologie und pädiatrische Neurologie am Albert Einstein College of Medicine in New York (Prof. Dr. Schaumburg, Prof. Dr. Moshé)
12/1998-3/1999	Chirurgische Abteilung am Stadtspital Triemli Zürich (Prof. Dr. Metzger)

Tätigkeiten als wissenschaftliche und medizinische Hilfskraft und Fördergelder:

10/1992	Gewährung eines Büchergeldes nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz
5-7/1994	Hilfswissenschaftliche Labortätigkeit in der Abteilung für Neurophysiologie an der Universität Würzburg (Prof. Dr. Schaible)
4-7/1995, 4-7/1996	Hilfsassistentin im Histologie-Studentenunterricht am Institut für Anatomie der Charité Berlin
6-8/1995	Mitarbeit in einer orthopädischen Praxis in Berlin-Hellersdorf
1995-1998	Regelmäßige Arbeit als Extrapflicht in der psychiatrischen Klinik der Charité Berlin
1-6/1998	Studentische Forschungsförderung am Institut für Anatomie der Charité Berlin
ab 3/2000	Medizinische Übersetzungstätigkeit

Besondere Kenntnisse:

Fremdsprachen:	Latein, Englisch, Altgriechisch, Russisch, Französisch, Spanisch, Schwedisch, Persisch
EDV-Kenntnisse:	Windows 98, Word 2000, Excel 7, Statview, Corel Draw 7, Star Writer, Star Calc

Publikationen

Journal-Artikel:

N.P. Hailer, A. Grampp and R. Nitsch: Microglial and Astrocyte Proliferation in the Dentate Gyrus Following Entorhinal Cortex Lesion: A Quantitative BrdU-Labeling Study (European Journal of Neuroscience, September 1999)

Poster:

A. Grampp, R. Nitsch und N.P. Hailer: Mikroglia- und Astrozytenproliferation im Hippokampus der Ratte nach entorhinaler Läsion
(Jahrestagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft in Greifswald, März 1998)

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch für die Ermöglichung einer Doktorarbeit und einer wissenschaftlichen Publikation danken. Seine Anregungen und Hinweise während der Betreuung waren mir stets eine große Hilfe. Herrn Dr. Nils Hailer danke ich für die Mitbetreuung und Korrektur, und Frau Dr. Silvia Diekmann für die anfängliche Mitbetreuung.

Im Laufe meiner praktischen Arbeit waren mir sehr hilfreich: Frau Schröder (leitende MTA der Abteilung für experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik Frankfurt am Main), Frau Dr. Martina Plaschke, Frau Angela Hildebrandt, Dorit Haas, Frau Sabine Winkler, Herr Dr. Karl Roth, Frau Meier (Institut für Anatomie, Charité Berlin) sowie Frau Hüttig (Firma Scripton). Danke an Frau Susan J. Letham, sie war immer der zentrale und zuverlässigste Anlaufpunkt. Frau Brigitte Mannsfeld aus der Grafikabteilung gebührt mein besonderer Dank. Sie war mir eine sehr wichtige Hilfe bei meinen graphischen Arbeiten, durch ihre kompetenten Fähigkeiten und ihre stete, schnelle, unkomplizierte Hilfsbereitschaft.

Besonders erwähnenswert ist, daß ich tage- und nächtelang die Computer von Uli Busch, Agnes Warncke, Allison Bloom und Paolo Bolognese in Beschlag nehmen und außerdem die WG meines Brüderchens Bobby strapazieren durfte. Außerdem danke ich Paolo Bolognese und Prof. Dr. Mitch Steinschneider für ihre Hilfe bei der Beschaffung notwendiger Computerprogramme während meines Aufenthaltes in New York.

Schließlich danke ich Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch für seinen freundlichen Einsatz, mir den Bezug von studentischen Forschungsförderungsgeldern zu ermöglichen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die an der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Proliferation von Mikrogliazellen und Astrozyten im Hippokampus der Ratte nach experimenteller Läsion des entorhinalen Kortex

am Institut für Anatomie an der Charité Berlin in der AG Zell- und Neurobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Nitsch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. keinem Fachbereich für Humanmedizin ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, 18.5.2000

ABSTRACT

Entorhinal cortex lesion of adult rats induces glial activation and proliferation in the deafferented dentate molecular layer. Double-labelling immunocytochemistry for the astrocyte-specific antigen glial fibrillary acidic protein or the microglial cell marker *Griffonia simplicifolia* isolectin B₄ with bromodeoxyuridine detection revealed that microglia counts and the proliferation rate in the ipsilateral dentate gyrus reached a maximum in the molecular layer at 3 days post-lesion (dpl) and returned to control levels by 30 dpl. Astrocyte counts in the ipsilateral dentate gyrus peaked at 30 dpl, with maximum proliferation at 7 dpl. At 100 dpl the astrocyte count had reverted to control levels. Glial proliferation was not restricted to the ipsilateral molecular layer but also occurred to some degree in the granule cell layer and the contralateral dentate gyrus. Thus entorhinal cortex lesion induces a rapid microglial reaction and long-lasting astrocyte activation in the deafferented termination zone of the perforant path. To conclude, glial proliferation after entorhinal cortex lesion follows a complex temporal and spatial pattern that coincides with processes of neuronal and axonal reorganization.

KEY WORDS: Hippocampus, entorhinal cortex lesion, glial proliferation, astrocytes, microglia, bromodeoxyuridine

ABSTRACT

Die Läsion des entorhinalen Kortex bei adulten Ratten induziert in der deafferenzierten Molekularschicht des Gyrus dentatus eine Gliaaktivierung und -proliferation. Histochemische Doppelfärbungen auf das astrozytenspezifische Antigen Glial fibrillary acidic protein oder den Mikrogliamarker *Griffonia simplicifolia* isolectin B₄ und Bromodeoxyuridin haben gezeigt, daß die Mikrogliazellzahlen in der Molekularschicht des Gyrus dentatus 3 Tage nach Läsion (dpl) ein Maximum erreichten und 30 dpl auf Kontrollwerte zurückgingen. Die Astrozytenzahlen im ipsilateralen Gyrus dentatus erreichten 30 dpl ein Maximum, ihre größte Proliferationsaktivität war 7 dpl zu beobachten. 100 dpl waren die Astrozytenzahlen auf Kontrollwerte zurückgegangen. Die Gliaproliferation war nicht auf die ipsilaterale Molekularschicht beschränkt, sondern trat auch zu einem bestimmten Grad in der Körnerzellschicht und im kontralateralen Gyrus dentatus auf. Somit ruft eine entorhinale Kortextläsion eine rasche Mikrogliareaktion und eine langanhaltende Astrozytenaktivierung in der deafferenzierten Terminationszone des Tractus perforans hervor. Schließlich ist zu erwähnen, daß Gliaproliferation nach entorhinaler Läsion einem komplexen zeitlichen und räumlichen Muster folgt, das bei Prozessen der neuronalen und axonalen Reorganisation auftritt.

KEY WORDS: Hippokampus, entorhinale Kortextläsion, Gliaproliferation, Astrozyten, Mikroglia, Bromodeoxyuridin